

UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION UND ZUM MECHANISMUS
DES ERYTHROZYTENAGGREGATIONSWERTES

J o h a n n e s O t t l

Diss München
1904



AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE
Arbeitsgruppe für Experimentelle Medizin
Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer

UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION UND ZUM MECHANISMUS
DES ERYTHROZYTENAGGREGATIONSWERTES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
J o h a n n e s O t t l
aus
München

1984

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Neupert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. 2. 1984

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer für die gestellte Aufgabe und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Für die hervorragende Zusammenarbeit und technische Assistenz möchte ich mich ganz besonders bei Frau S. Koenig-Erich, sowie bei Herrn Dr. N. Boss bedanken, der mich kollegial beraten hat.

Der Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen (Vorstand Prof. Dr. W. Rudolph) des Deutschen Herzzentrums danke ich für die Überlassung der Blutproben und die Erlaubnis zur Einsichtnahme in die Krankenakten ihrer Patienten, ebenso den Mitarbeitern des MPI für Biochemie, Martinsried für ihre Bereitschaft zum Blutspenden.

Für die Bestimmung weiterer Laborparameter danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. D. Stamm am MPI für Psychiatrie. Herrn Dr. G. Heinemann am Institut für Klinische Chemie des Deutschen Herzzentrums (Vorstand Prof. Dr. H. Schievelbein) sei für seinen kollegialen Rat gedankt.

1.	EINLEITUNG	2
2.	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1	Die Probanden	7
2.1.1	Die Probanden der klinischen Unter- suchung	7
2.1.2	Probanden der in vitro-Versuche	10
2.1.3	Versuchstiere	10
2.2	Coulterprinzip	10
2.3	Verbesserte Coultermethode nach KACHEL	12
2.3.1	Einfluß von Partikelform und Geometrie der Meßöffnung	12
2.3.2	Einfluß des Elektrolyten im Hüllstrom	13
2.4	Das Zellvolumenmeßgerät "Metricell" nach KACHEL	14
2.4.1	Prinzip des Aufbaus des Meßsystems	15
2.4.2	Prinzip des Volumenanalysators	17
2.4.3	Eichung des Metricell	17
2.5	Messung des AW	20
2.5.1	Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben, Ablauf der AW-Messung	20
2.5.2	Die AW-Berechnung	23
2.6	Reabilität des AW	24
2.7	Messung der Laborparameter	25
2.7.1	Bestimmung von Fibrinogen und Fibro- nectin	25
2.7.2	HDL-C und LDL-C Bestimmung	28
2.7.3	Weitere Laborparameter	29
2.8	Statistische Methoden	30
2.8.1	Überblick	30
2.8.2	Mittelwertvergleich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe mit dem U-Test (47)	32
2.8.3	Berechnung der Korrelationen zwischen den verschiedenen Meßwerten mit der Spearman'schen Rangkorrelation (47)	33
2.8.4	Berechnung des partiellen und des mul- tiplen Korrelationskoeffizienten (47)	34
2.8.5	Die Berechnung von Sensitivität, Spezifität, Effizienz und Vorhersagewert	35
2.9	Methoden zur Untersuchung der Dosis-Wirkung - Beziehung zwischen Fibrinogen, bzw. Fibrinogen/Albumin- und Fibrinogen/Fibronec- tin-Gemischen und dem AW	38

2.10	Methoden zum Kaninchen-Cholesterinversuch	39
3.	ERGEBNISSE	40
3.1	Die klinische Untersuchung	40
3.1.1	Mittelwertsvergleich der Meßergebnisse und deren Korrelationen zum AW	40
3.1.2	Sensitivität, Spezifität, Effizienz und Vorhersagewert des AW und von Fibrinogen im Vergleich zu ihrer Kombination	51
3.1.3	Sensitivität, Spezifität, Effizienz und Vorhersagewert des AW, von HDL-C bzw. Cholesterin/HDL-C und deren Kombination mit dem AW im Vergleich	54
3.2	Die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Fibrinogen, bzw. Fibrinogen/Albumin- und Fibrinogen/Fibronectin-Gemischen und dem AW	62
3.3	Der Kaninchen-Cholesterinversuch	64
4.	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	66
4.1	Der klinische Versuch	66
4.2	Die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Fibrinogen, bzw. Fibrinogen/Albumin- und Fibrinogen/Fibronectin-Gemischen und dem AW	74
4.3	Der Kaninchen-Cholesterinversuch	75
4.4	Ausblick	77
5.	ZUSAMMENFASSUNG	78
6.	LITERATUR	82

AW	Erythrozytenaggregationswert
BKS	Blutkörperchensenkung Mittel aus 1.+ 2. Std.
Broca	Broca Index
Chol	Serumcholesterin
EFF	Effizienz
F'gen	Fibrinogen
F'nectin	Fibronectin
FN	falsch negatives Testergebnis
FP	falsch positives Testergebnis
Harns	Serumharnsäure
HDL-C	High Density Lipoprotein Cholesterin
HK	Hämatokrit
KHE	koronare Herzerkrankung
KHE-Pat	KHE-Patientengruppe
Kontrolle A	ambulante Kontrollgruppe
Kontrolle B	stationäre KHE-freie Kontrollgruppe
LDL-C	Low Density Lipoprotein Cholesterin
MÖ	Meßöffnung des Metricell
MPI	Max Planck Institut
PRAE	Prävalenz
PV	predictive value = Vorhersagewert
RN	richtig negatives Testergebnis
RP	richtig positives Testergebnis
SD	Standardabweichung
SENS	Sensitivität
SPEZ	Spezifität
Triglyc	Serumtriglyceride
vk	Variationskoeffizient
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

1. EINLEITUNG

Seit den Jahren nach dem 2. Weltkrieg konnten die Infektionskrankheiten als häufigste Todesursache, zumindest in den industrialisierten Staaten, durch die Entwicklung der Antibiotika beseitigt werden. Währenddessen nahm der Anteil der durch Erkrankungen des Kreislaufsystems bedingten Todesfälle in der BRD kontinuierlich bis auf 50,8 % (51) im Jahre 1981 zu; davon waren 1960 etwa 22 % ischämische Herzerkrankungen (50), zwanzig Jahre später aber schon 36 % (51). Diese Zahlen verdeutlichen das wachsende Problem der ischämischen Herzerkrankungen.

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigten sich mit der Früherkennung einer Gefährdung durch eine koronare Herzerkrankung (KHE) und der Ermittlung von Risikofaktoren. Hypercholesterinämie, starkes Zigarettenrauchen und arterielle Hypertonie kristallisierten sich als besonders gefährlich heraus, außerdem Diabetes mellitus, Hyperurikämie und Adipositas. Vor allem hat eine Kombination mehrerer Risikofaktoren eine potenzierende Wirkung auf die Inzidenzrate der KHE (28). Andererseits muß beim Vorliegen eines oder mehrerer Risikofaktoren nicht zwangsläufig eine KHE folgen (1). Deren Bestimmung ermöglicht lediglich eine Aussage über die Erkrankungswahrscheinlichkeit eines Individuums, wobei persönliche Faktoren wie Alter, Geschlecht, familiäre Disposition, Einnahme von Medikamenten, Streß, und körperliche Aktivität zu berücksichtigen sind. Hinzu kommt

die Schwierigkeit einer sicheren Frühdiagnose mit den zur Zeit verfügbaren Routinemethoden. Ruhe- bzw. Belastungs-EKG erbringen zu häufig falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse. Nuklearmedizinische Untersuchungstechniken und die Koronarangiographie sind wegen des hohen Aufwandes, der nicht beliebigen Wiederholbarkeit und des nicht zu unterschätzenden Risikos als Suchmethode ungeeignet und bedürfen einer strengen Indikationsstellung.

Mit der von KACHEL (30,31) verbesserten Coultermethode zur Bestimmung von Volumenverteilungen von Zellen gelang es BOSS et al. (6-8) erhebliche Unterschiede im Ausmaß der Erythrozytenaggregation zwischen Gesunden und an KHE-Erkrankten festzustellen. Die Erythrozytenaggregation ist eine reversible, aber relativ feste Aneinanderlagerung von Erythrozyten, die unter bestimmten Meßbedingungen mit der oben genannten Methode als mehrgipflige Zellvolumenverteilung gemessen werden kann (Abb. 1). Der hohe Gipfel der Abbildung gibt die Zahl der Einzelzellen wieder, der zweite Zweiergruppen und der dritte Dreiergruppen von Erythrozyten. Das genormte Verhältnis der in Gruppen befindlichen Erythrozyten zur Gesamtzahl der Erythrozyten wird als Erythrozytenaggregationswert (AW) bezeichnet. KHE-Patienten und in geringerem Maß auch Träger von Risikofaktoren haben im Vergleich zu gesunden Normalpersonen einen signifikant erhöhten AW (7). Auffällig ist das parallele Verhalten des AW hinsichtlich der sich potenzierenden Wirkung von Risikofaktoren für eine KHE zur klinischen Beobachtung (7,28).



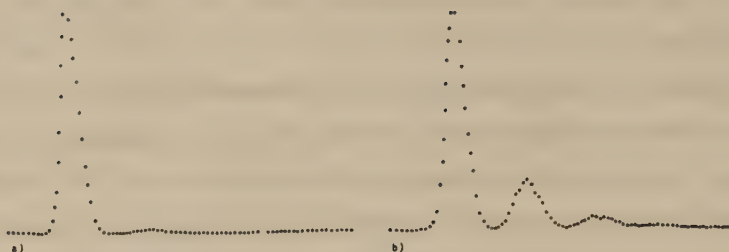


Abb. 1: Volumenverteilung der Erythrozyten eines gesunden Probanden (a) und eines an KHE-Erkrankten (b)

Nach diesen Vorarbeiten bestätigten PORZ et al. (44,46) diese Ergebnisse mit einer breit angelegten Untersuchung an 658 Personen und bewiesen, daß die Qualitätsmerkmale des AW über denen der anderer Risikofaktoren liegen. Die Messung des AW ermöglicht eine Wahrscheinlichkeitsaussage über die mögliche Gefährdung eines Patienten durch eine KHE, bzw. arteriosklerotische Veränderungen schon in einem frühen Stadium, in dem invasive oder sehr aufwendige Untersuchungsmethoden nicht indiziert sind. Besonders gilt dies für Diabetiker (46), deren Gefäßveränderungen häufig im Bereich kleiner und kleinster Gefäße beginnen.

Aus früheren Untersuchungen (6-8) war bekannt, daß Zustände mit einer Akute-Phase-Reaktion einen gegenüber der Norm erhöhten AW aufweisen, z.B. akute Infektionen, schwere Operationen oder Herzinfarkt vor weniger als einem halben Jahr, aber auch eine bestehende Schwangerschaft (58).

Andererseits führt die Medikation mit Lipidsenkern, Thrombozytenaggregationshemmern, Corticoiden, Antirheumatika und Schmerzmitteln zu einem erniedrigten AW. Bei der Validierung des AW in der Untersuchung von PORZ (44,46) wurden deshalb diese Zustände als Ausschlusskriterien bewertet.

Ziel dieser Arbeit ist es, dazu beizutragen, die physiologischen Grundlagen des AW aufzuklären. Deren genauere Kenntnis soll vor allem Ursachen für falsch negative AW-Werte aufdecken. Das Ziel ist, bei möglichst gleichbleibend hoher Spezifität, eine weitere Verbesserung der Sensitivität zu erreichen, um bei einem normalen AW eine Gefährdung des Patienten durch eine KHE weitestgehend ausschließen zu können (36).

Hierzu wurden vier Gruppen von Versuchen durchgeführt:

- Auf Grund von Kreuzversuchen ist bekannt (9), daß der die Erythrozytenaggregation verursachende Faktor in erster Linie im Plasma vorhanden sein muß. Hochmolekulare Substanzen spielen dabei eine wichtige Rolle. So hat Dextran mit einem Molekulargewicht von 250.000 stark aggregierende Eigenschaften (56). Eigene Versuche zeigten in vitro aggregationsfördernde Wirkungen von Fibrinogen und Fibronectin. Diese Befunde, die Tatsache des physiologischen Zusammenwirkens der beiden Proteine, sowie Arbeiten von KLINGEMANN (34) und STENMAN (53) veranlaßten uns zu folgender Untersuchung: Eine Gruppe von Patienten mit

einer angiographisch gesicherten hochgradigen Koronarstenose wurde mit einer diesbezüglich gesunden Probandengruppe verglichen. Unter anderem wurden die Plasmakonzentrationen der beiden genannten Proteine bestimmt und mit dem AW korreliert.

- Der zweite Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchung war der Versuch einer Korrelation zwischen dem AW und stoffwechselbedingten Risikofaktoren, insbesondere den Cholesterinfraktionen LDL und HDL. Die Autoren der "Israeli Ischaemic Heart Disease Study" (59) bezeichnen HDL-C als den besten prognostischen Parameter hinsichtlich einer durch KHE bedingten Mortalität.
- In vitro Versuche zum AW sind der dritte Teil dieser Arbeit. Fibrinogen, Fibronectin, Albumin, sowie bei 56 °C defibriniertes Plasma wurden auf ihre, den AW betreffende, Eigenschaften untersucht.
- Da eine erhöhte Cholesterinkonzentration im Serum ein Risikofaktor 1. Ordnung für die Entstehung einer KHE ist und dabei eine erhöhte Aggregationsneigung der Erythrozyten beschrieben ist (54), wurden in einer weiteren Versuchsreihe Kaninchen mit stark cholesterinhaltigem Futter ernährt, um zu sehen, ob durch eine exzessiv erhöhte Cholesterinkonzentration im Serum eine Erhöhung des AW erzielbar ist.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Die Probanden

2.1.1 Die Probanden der klinischen Untersuchung

Zum Vergleich von Fibrinogen und Fibronectin bei gesunden Personen und an KHE-Erkrankten und der Korrelation der beiden Parameter zum AW, war die Aufstellung von zwei Untersuchungskollektiven notwendig:

- Personen mit einer gesicherten KHE
- Personen ohne Hinweis auf eine KHE

Diagnostisches Kriterium für eine gesicherte KHE war eine durch Herzkatheter bewiesene mindestens 75 %-ige Stenose (abgesehen von 2 Patienten mit einer 50 %-igen Stenose) eines Koronarhauptstammes. Dies und die Verfügbarkeit weiterer Laborparameter machte die Zusammenarbeit mit einer Klinik nötig, zu der sich das Deutsche Herzzentrum (Station 2, Prof. Dr. W. Rudolph) bereiterklärte.

Bei der Gruppe der KHE-Patienten handelte es sich um stationäre Patienten. Sie wurden von den sie betreuenden Ärzten ausgewählt und um ihr Einverständnis gebeten. Das medizinische Personal wurde mehrfach über die Ziele und Ausschlusskriterien (s.Tab. 1) der Untersuchung unterrichtet.

Die Kontrollgruppe bestand überwiegend aus Mitarbeitern des MPI für Biochemie, die klinisch und anamnestisch keine Symptome einer KHE aufwiesen. Der Aufbau einer, durch Herzkatheter gesicherten KHE-freien Kontrollgruppe war nicht möglich, da, bedingt durch die Prävalenz der KHE im Deutschen Herzzentrum, eine ausreichend große Fallzahl in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht erreicht werden konnte.

Die Auswahl der meist seit Jahren bekannten Probanden erfolgte nicht nach rein zufälligen Kriterien. Vielmehr sollten auch Probanden mit einem höheren AW in der Kontrollgruppe erfaßt werden, um eine größere Aussagekraft der Mittelwertsvergleiche und der Korrelationen von Fibrinogen und Fibronectin, sowie weiterer Laborwerte zu erzielen. So könnte bei einer hohen Korrelation zwischen Fibrinogen und AW bei ausschließlich niedrigen Aggregationswerten keine Aussage über einen kausalen Zusammenhang Fibrinogen - AW gemacht werden. Miteingeschlossen waren auch Träger von Risikofaktoren, die einen höheren AW verursachen (7). Für eine durch Herzkatheter gesicherte KHE-freie Kontrollgruppe würde die gleiche Problematik gelten.

Als Vergleichsgruppe für die HDL-C Werte und den daraus berechneten Quotienten diente eine von PORZ (44) vor kurzem untersuchte Patientengruppe aus dem Deutschen Herzzentrum, bei der eine KHE durch Herzkatheter ausgeschlossen war. Dieses Vorgehen war notwendig, da wegen der Bestimmung des HDL-Cholesterins nur eine Kontrollgruppe aus dem Deutschen Herzzentrum in Frage kam.

Wegen der größeren Gefährdung und der damit verbundenen höheren Prävalenz, weiterhin um geschlechtsspezifische Unterschiede auszuschließen und wegen besserer Vergleichbarkeit wurden bei dieser Untersuchung nur Männer über 35 Jahre ausgewählt. Jeder Proband ging nur einmal in die Untersuchung ein. Ausgeschlossen waren Personen, bei denen eines der in Tab. 1 aufgeführten Kriterien (in Anlehnung an BOSS et al. und PORZ et al. (6-8,44,46)) vorlag.

Tab. 1: Ausschlusskriterien

- Medikation vor weniger als einer Woche mit
 - Lipidsenkern
 - Thrombozytenaggregationshemmern
 - Corticoiden
 - Antirheumatica
 - Schmerzmitteln
- Vorhandensein einer Akute-Phase-Reaktion nach
 - Herzinfarkt
 - Embolie
 - schwerer Operation oder Unfall
 - Impfung
- Akute Infektion
- Deutliche Erhöhung der Blutkörperchensenkung,
 - d.h. BKS (1.Std. + 2.Std.)/2 > 35 mm

Es wurden 23 KHE-Patienten untersucht. Sieben davon mußten wegen eines Ausschußgrundes nachträglich aus der Auswertung genommen werden, ein weiterer wegen einer geronnenen Blutprobe. Damit verblieben 15 Patienten, d.h. 65,2 %. Die Kontrollgruppe umfaßte 12 Probanden, die KHE-freie Patientengruppe von PORZ 16 Personen.

2.1.2 Probanden der in vitro-Versuche

Das erforderliche Blut für die in vitro Experimente wurde Mitarbeitern des Instituts abgenommen. Es galten die gleichen Ausschußkriterien wie bei der klinischen Untersuchung (s. Tab. 1).

2.1.3 Versuchstiere

Für das Tierexperiment wurden drei gesunde weibliche Kaninchen aus der institutseigenen Tierzucht verwendet.

2.2 Coulterprinzip

1953 beschrieb COULTER (13) eine neuartige Methode, die eine schnelle und automatische Messung von Anzahl und Größe mikroskopisch kleiner Partikel ermöglicht. Im medizinischen Bereich erfolgt heute das Auszählen von Zellen sehr oft mit Geräten, die auf obigem Verfahren basieren.

Dazu müssen die Zellen in einem elektrisch leitenden Medium suspendiert sein. Sie passieren eine feine zylindrische Meßöffnung (MÖ) (Abb. 2, Detailzeichnung), durch die gleichzeitig ein hochstabilisierter Gleichstrom fließt. Die

Elektroden befinden sich auf beiden Seiten der MÖ. Der Widerstand des Gesamtsystems beruht fast ausschließlich auf dem Widerstand an der MÖ. Der Durchtritt der sehr schlecht leitenden Zellen durch die MÖ hat einen impulsartig zunehmenden Widerstand zur Folge. Diese Widerstandsänderung ist der Größe der passierenden Zellen direkt proportional. Nach dem Ohm'schen Gesetz ergeben sich direkt proportionale Spannungsänderungen, die verstärkt und von einem automatischen Analysator gespeichert werden. Die Impulshöhenverteilung entspricht damit der Volumenverteilung der gemessenen Zellen. Allerdings haben die mit dem ursprünglichen Coulterverfahren gemessenen Zellvolumenverteilungen eine apparativ bedingte deutliche Rechtsschiefe (40), so daß genauere Zellvolumenverteilungsuntersuchungen damit nicht möglich sind.

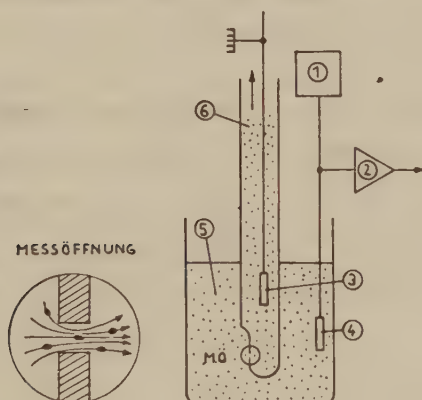


Abb. 2: Prinzip der Volumenmessung nach Coulter

1-Gleichstrom; 2-Verstärker; 3,4-Elektroden;

5-Zellsuspension; 6-Sog; MÖ-Meßöffnung.

2.3 Verbesserte Coultermethode nach KACHEL

2.3.1 Einfluß von Partikelform und Geometrie der Meßöffnung

Bei der ursprünglichen Coultermethode erzeugen Partikel, die die MÖ im Randbereich passieren, wegen des an den beiden Kanten der MÖ dichteren elektrischen Feldes M-förmige Impulse. Sie sind höher als jene, die von Partikeln, die die Kapillarmitte passieren, verursacht werden und verursachen damit die Rechtsschiefe der Volumenverteilungskurven (40). Dies gilt im Prinzip für kurze und lange MÖ, wobei bei letzteren zusätzlich noch die Gefahr einer zunehmenden Koinzidenz, d.h. des gleichzeitigen Aufenthalts mehrerer Zellen in der MÖ auftritt (31). Eine im Längsschnitt quadratische MÖ hat sich am besten bewährt.

METZGER und KACHEL (40) zeigten, daß auch die Partikelform und -konsistenz wesentlichen Einfluß auf das Meßergebnis haben. So werden bikonkav fixierte Erythrozyten im Randbereich der MÖ stärker überbewertet als rund fixierte Erythrozyten. Native Erythrozyten werden noch stärker überbewertet. Dabei spielt die Konsistenz eine erhebliche Rolle. Während im Zentralstrahl die Erythrozyten torpedoförmig ausgerichtet sind, können sie sich in Wandnähe der MÖ drehen und haben eine Vielzahl von Verformungsmöglichkeiten. Die Kombination der hydrodynamisch und elektrisch bedingten Fehlerquellen ergibt eine Überbewertung des Zellvolumens im Randstrahl von über 50 %.

Durch die Verwendung einer Zentralstrahlkapillare (32) und die damit verbundene hydrodynamische Fokussierung wird der Partikelstrom in der Zentralachse der MÖ konzentriert. Dieses Verfahren ermöglicht relativ kurze MÖ, wodurch das Problem der Koinzidenz vermindert wird, die durch eine nicht zu hohe Zählrate weiter reduziert werden kann. Die Koinzidenz beträgt z.B. bei einer MÖ-Länge von 100 μm , einer Partikelzählrate von 1000 Zellen/s und einer Durchtrittsgeschwindigkeit von 5 m/s etwa 1 %.

2.3.2 Einfluß des Elektrolyten im Hüllstrom

Zur Messung der Zellen im Zentralstrahl ist ein Hüllstrom nötig, der diesen umgibt. Dabei muß, um überhaupt meßbare Impulse zu erhalten, eine unterschiedliche elektrische Leitfähigkeit von Elektrolyten und zu messenden Zellen gegeben sein, der Hüllstrom aber die gleiche elektrische Leitfähigkeit haben wie der Elektrolyt der Zellsuspension. Die Leitfähigkeit des Hüllstromelektrolyten (Zusammensetzung: 8 g NaCl, 1 g Natriumacid, Aqua dest. ad 1000 ml) muß wöchentlich mit der des Suspensionselektrolyten verglichen und gegebenenfalls korrigiert werden. Die durch Schwankungen der Umgebungstemperatur verursachten Veränderungen der elektrischen Leitfähigkeit werden durch die Verwendung eines Verstärkers mit Rückkopplungssteuerung ausgeglichen.

Eine weitere Voraussetzung für eine einwandfreie Messung ist ein partikelfreier Hüllstromelektrolyt, da sonst Störungen in der Volumenverteilung oder gar ein Verstopfen der MÖ die

Folge wären. Alle verwendeten Lösungen wurden filtriert (Membranfilter, Porengröße $0,2\text{ }\mu\text{m}$; Fa. Sartorius, Göttingen) und mit der Wasserstrahlpumpe entgast, da kleine Gasbläschen den gleichen Effekt wie Schmutzteilchen haben.

2.4 Das Zellvolumenmeßgerät "Metricell" nach KACHEL

Das Metricell-Gerät (Abb. 3) von KACHEL et al. (30-32) basiert auf diesen Erkenntnissen, weist damit die Fehler des ursprünglichen Coulterverfahrens nicht mehr auf und ermöglicht eine exakte Unterscheidung einzelner und aggregierter Zellen auf Grund ihrer Volumina.

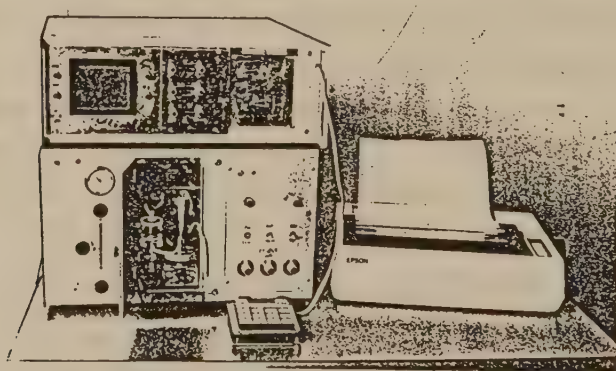


Abb. 3: Der Metricell .

Es umfaßt das Meßsystem einschließlich einer elektrischen Pumpe, das elektrische Versorgungssystem, die elektronischen Geräte zur Impulshöhen- bzw. Volumenanalyse und einen Schnelldrucker. Dieses Gerät wurde für die vorliegende Arbeit verwendet.

2.4.1 Prinzip des Aufbaus des Meßsystems

Das Meßsystem (Abb. 4) besteht aus der eigentlichen Meßkammer, einem Vorratsbehälter (1), der den partikelfreien Hüllstromelektrolyt enthält und einer Regulierkammer (2), deren Schwimmer den Zustrom des Hüllstromelektrolyten in den oberen Teil der Meßkammer kontrolliert. Die zu messende Zellsuspension wird in einer großen Eppendorfspitze (10) auf das Zuführungsrohr der Meßkammer aufgesetzt. Unter einem Sog von $2,5 \text{ kp/cm}^2$ fließt die Partikelsuspension durch die Zentralstrahlkapillare (4) und wird durch deren Spitze (Innen- $\varnothing$ ca. $100 \mu\text{m}$) als feiner Strahl in die Achsenmitte der MÖ (11) ($\varnothing$ ca. $80 \mu\text{m}$) konzentriert. Beim Durchtritt durch die MÖ passieren die zu messende Zellsuspension und der Hüllstromelektrolyt das von zwei Elektroden gebildete homogene elektrische Feld. Aus dem unteren Teil der Meßkammer wird das Zell-Elektrolytgemisch von der angeschlossenen Pumpe in einen Abwasserbehälter abgesaugt.

Die Steuerung der Partikelzählrate während der Messung erfolgt durch die Regulierkammer, gemäß dem Gesetz der kommunizierenden Röhren. Eine Veränderung der Höhendifferenz h zwischen den beiden Flüssigkeitsspiegeln in der Regulierkammer und dem Partikelsuspensionsbehälter beeinflusst die Stärke des Partikelstroms aus der Zentralstrahlkapillare durch die MÖ.

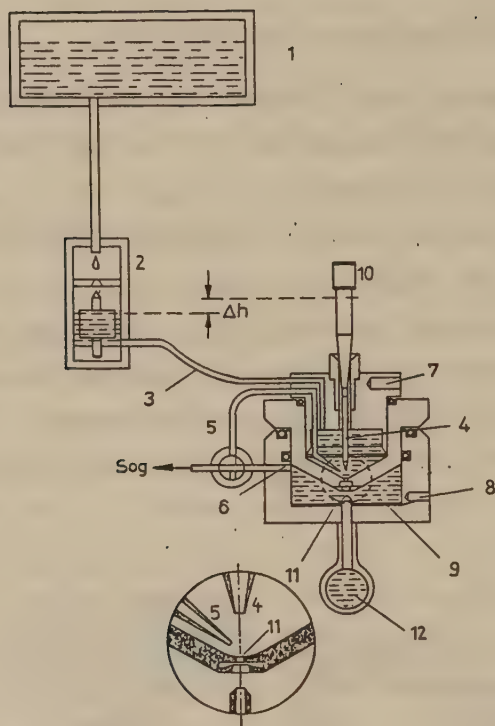


Abb. 4: Meßsystem des Metricell

1-Vorratsbehälter mit Elektrolyt; 2-Regulier-
kammer; 3-Elektrolytzufuhr; 4-Zentralstrahl-
kapillare; 5-Absaugeinrichtung für die Ober-
kammer; 6-Absaugeinrichtung für das Zell/Elektro-
lytgemisch aus der Unterkammer; 7-Anschluß für
die positive Elektrode am Oberteil der Meßkammer;
8-Anschluß für die negative Elektrode am Unter-
teil der Meßkammer; 9-Negative Elektrode;
10-Behälter mit der Zellsuspension; 11-Meßöffnung
(Mö); 12-Gummiball zur Spülung der Mö von unten.

2.4.2 Prinzip des Volumenanalysators

Die von den Partikeln beim Durchtritt durch das homogene elektrische Feld in der MÖ hervorgerufenen Impulse werden in einem Vielkanal-Impulshöhenanalysator gespeichert. Impulse gleicher Höhe werden einer Adresse zugeordnet und die Zahl aller Impulse einer Adresse im Impulshöhenanalysator aufsummiert. Für die Erythrozytenaggregationsmessung wird das Histogramm in 128 einzelne Adressen von 256 maximal möglichen unterteilt. Diese Auflösung ist für diesen Zweck voll ausreichend (32).

Das gespeicherte Histogramm kann auf dem Bildschirm eines Oszillographen sichtbar gemacht oder mit einem Schreiber auf Papier ausgegeben werden. Mittels zweier beliebig verschiebbarer elektronischer Marker ist es möglich, Teile des Histogramms abzugrenzen und durch einen im Impulshöhenanalysator eingebauten Kleincomputer die Zahl der zwischen den Markern liegenden Adressen zugeordneten Zellen zu berechnen und mit Leuchtdioden anzuzeigen.

2.4.3 Eichung des Metricell

Auch im täglichen Routinebetrieb ist eine Eichung des Meßgeräts unerlässlich. Sie wird sowohl in Form einer elektrischen als auch einer Partikeleichung durchgeführt. Die elektrische Eichung erfolgt durch eine Impulsspannung bekannter Höhe über Eichwiderstände. Lage und Form des Eichgipfels geben Aufschluß über den Zustand der MÖ, die

Leitfähigkeit des Elektrolyten und die elektrische Einstellung des Geräts.

Die Partikeleichung dient in erster Linie der Kontrolle der Zellvolumenverteilung. Latexpartikel in entsprechender Größe erwiesen sich wegen meist zu großer Fertigungstoleranzen und ungünstiger Volumenverteilungen, sowie wegen der geringen Verformbarkeit und des hohen Preises als wenig geeignet. Die Partikeleichung wird mit glutaraldehyd-fixierten Erythrozyten, die einmal in größerer Menge in unserem Labor von einem Spender abgenommen wurden, durchgeführt. Sie können in einer Elektrolytlösung unter Zugabe von 0,2 % Natriumacid lange Zeit volumenkonstant aufbewahrt werden. Die elektrische Eichung erfolgt während der Partikeleichung in einem Meßgang.

Zusätzlich wird bei jedem Probanden die Volumenverteilung der nativen Erythrozyten durch eine Messung in einer physiologischen Elektrolytlösung zusammen mit einer elektrischen Eichung gemessen. Eine anomale Volumenverteilung kann dabei nicht durch eine starke Erythrozytenaggregation verschleiert werden. Diese Eichungen werden täglich durchgeführt und in einem Eichprotokoll dokumentiert.

Von der für die AW-Messung verwendeten 2,5 %-igen Dextranlösung wird mehrmals zur Kontrolle und bei jedem Neuansatz zum Vergleich mit der bisher verwendeten Lösung eine Dextranverdünnungskurve (Abb. 5a) erstellt (9). Dabei werden native Erythrozyten anstatt in EDTA-Plasma in verschiedenen stark konzentrierten Dextranlösungen suspendiert.

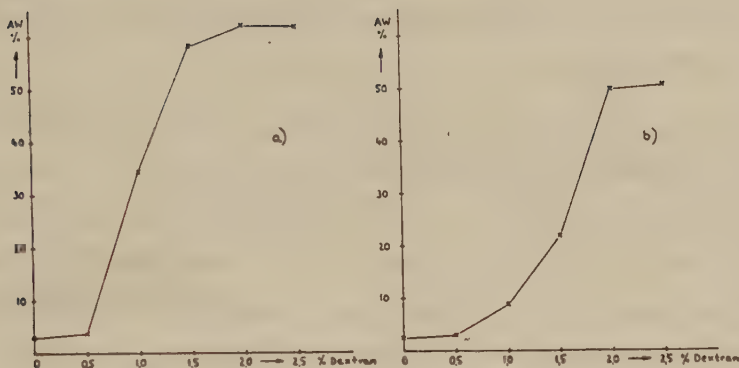


Abb. 5: Dextranverdünnungskurven mit Erythrozyten vom Menschen (a) und vom Kaninchen (b)

Die Verdünnung erfolgt mit physiologischer Elektrolytlösung. Bei den 2,0 % und 2,5 %-igen Lösungen bildet sich in der Dextranverdünnungskurve ein Plateau. Damit erreicht die aggregationsfördernde Wirkung des Dextrans ein stabiles Niveau, das für die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Meßwerte entscheidend ist. Dextranverdünnungsreihen mit Kaninchenerythrozyten zeigen eine Rechtsverschiebung im Kurvenverlauf, d.h. zu einer Erythrozytenaggregation sind höhere Dextranskonzentrationen notwendig (Abb. 5b). Die prinzipielle Aggregationsfähigkeit dieser Zellen wird damit bewiesen.

2.5 Messung des AW

2.5.1 Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben, Ablauf der AW-Messung

Die Gewinnung der Blutproben erfolgte nach Desinfektion der Punktionsstelle und möglichst kurzer Stauung mit einer 1,1mm Butterflykanüle (Venofix[®]) durch Punktion der Vena cubitalis. Je 10 ml Blut wurden in ein EDTA-beschichtetes und zusätzlich mit 100 µl Aprotinin (Trasylo[®]) versehenes Polystyrolröhrchen (No. 16/100; Fa. Greiner, Nürtingen) getropft und sofort dreimal umgedreht, um eine gute Durchmischung mit dem Anticoagulans zu erreichen. Aprotinin dient der Verhinderung einer eventuellen Proteolyse, beeinflusst die AW-Messung jedoch nicht (8).

Zusätzlich wurde von den Probanden der Kontrollgruppe 2 ml Citratblut (3,8 % Natriumcitrat, 1:5) zur Bestimmung der BKS nach WESTERGREN und 5-10 ml Blut in einem Glasröhrchen zur Bestimmung der Laborparameter entnommen.

Entsprechend den anatomischen Gegebenheiten erfolgte die Blutentnahme bei den Kaninchen durch die Punktion der Ohrvene mit einer Braunüle[®]. Vor der Punktion wurde die Punktionsstelle rasiert und die Vene mit Xylol zum Hervortreten gebracht. Nach der Punktion wurde es mit Isopropylalkohol sorgfältig wieder entfernt.

Vom ersten EDTA-Röhrchen jedes Spenders wurden mehrere Vollblutproben abpipettiert (je 0,5 ml in 1,5 ml Reagiergefäße

aus Polypropylen; Fa. Brand, Wertheim), sowie Blut zur Bestimmung des Mikrohämatokrit entnommen. Der verbliebene Rest des EDTA-Vollblutes wurde 10 min bei 1800 g (Röhrchenmitte) und 22 °C zentrifugiert (Minifuge 2; Heraeus Christ, Osterrode). Die Zentrifuge wurde beim Auslaufen nicht gebremst. Das im Überstand befindliche plättchenarme Plasma wurde in Mehrzweckgefäßen (aus Polystyrol; Fa. Greiner, Nürtingen) gepoolt und anschließend zu je 1,5 ml in Reagiergefäße verteilt.

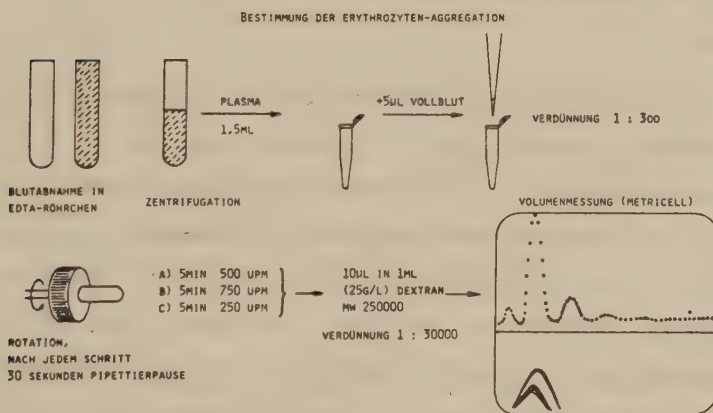


Abb. 6: Ablauf der AW-Messung

Abb. 6 zeigt den Ablauf der AW-Messung. Vor der Messung wurden zu einer 1,5 ml-Probe plättchenarmen Plasmas 5 µl autologes EDTA-Vollblut aus der dreimal umgedrehten Vollblutprobe hinzupipettiert. Das Reagiergefäß mit der Erythro-

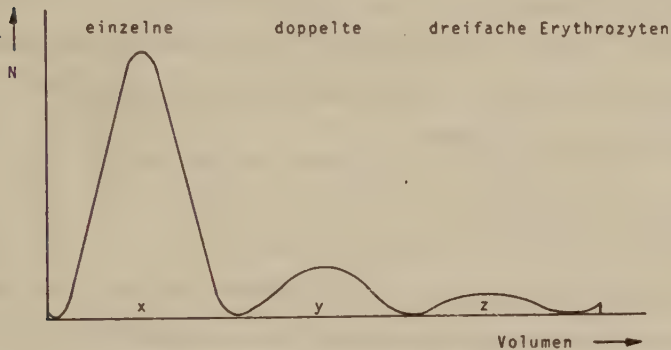
zyten-Plasmasuspension wurde nacheinander jeweils 5 min mit 500, 750 und 250 Umdrehungen/min um die Längsachse rotiert und dabei definierten Scherkräften ausgesetzt. Nach jedem Rotationsschritt wurde die Rotation für 30 Sekunden unterbrochen und mit einer Eppendorfpipette 10 μ l der Erythrozytensuspension entnommen. Diese 10 μ l wurden sofort in 1 ml 2,5 %-iger Dextran 250 (Fa. Roth, Karlsruhe)/NaCl-Lösung (pH ca. 7,4; ca. 285 mosmol, ca. 12,0 mS) gegeben und mit einer 1000 μ l Eppendorfpipette wieder aufgenommen. Deren Pipettenspitze wurde abgenommen, auf die Meßkammer aufgesteckt und sofort die Volumenverteilung der Erythrozyten dieser Probe bestimmt.

Die drei Rotationsschritte und die weitere Verdünnung in der Dextranlösung erwiesen sich in früheren Versuchen am besten zur AW-Messung geeignet und zeigten sehr hohe Reproduzierbarkeit. Die Hohe Endverdünnung des Vollblutes von 1:30.000 macht einerseits die AW-Messung vom jeweiligen Hämatokrit unabhängig, andererseits verhindert sie einen Einfluß auf die bestehenden Erythrozytenaggregate durch die Dextranverdünnung während der Meßzeit von etwa 3 Minuten. Die nach dem Einwirken der Scherkräfte bestehenden Aggregate werden durch das Dextran gleichsam "eingefroren" (43).

Der ordnungsgemäße Verlauf der Messung wurde laufend am Oszilloskop beobachtet und bei Veränderung des Impulsmuster sofort unterbrochen. Nach Beseitigung der Störung wurde die Messung fortgesetzt. Die Messung endete automatisch, wenn in einem Kanal 3200 Zellen registriert waren.

2.5.2 Die AW-Berechnung

Zunächst wurde für jeden der drei Rotationsschritte der Anteil der aggregierten Erythrozyten an der Gesamtzahl der gemessenen Erythrozyten einer Meßprobe berechnet (Abb. 7).



$$\text{Anteil der aggregierten Zellen} = \frac{100(2y+3z)}{x+2y+3z} \%$$

$x = n$ der einzelnen Erythrozyten

$y = n$ der zweifach aggregierten Erythrozyten

$z = n$ der dreifach aggregierten Erythrozyten

Abb. 7: Berechnung des Anteils der aggregierten Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten in der Meßprobe (8,58)

Daraus ergibt sich der AW nach der Formel (7)

$$\text{AW} (\%) = (a + 2b + c) / 4 ,$$

wobei

a = Anteil der aggregierten Erythrozyten bei 500 U/min

b = Anteil der aggregierten Erythrozyten bei 750 U/min

c = Anteil der aggregierten Erythrozyten bei 250 U/min

bedeuten. Die Gewichtung von b soll die auch bei der Einwirkung größerer Scherkräfte noch bestehenbleibenden Erythrozytenaggregate stärker berücksichtigen. Außerdem hat b die geringste Streubreite (58).

2.6 Reabilität des AW

PORZ (44) beschrieb bei der klinischen Validierung des AW eine deutliche Abnahme des AW in der ersten Stunde nach der Blutabnahme, die dann in einen flacheren Abfall während der nächsten 6 Stunden übergeht. Dieser auch individuell verschieden starke Abfall macht die Vergleichbarkeit der AW-Werte problematisch, da die Zeitspanne zwischen Blutabnahme und Messung, bedingt durch Transport und Aufbereitung, nicht immer konstant gehalten werden konnte.

Bei der Untersuchung von 89 AW-Verläufen von gesunden und an KHE-erkrankten Probanden errechnete PORZ (44) eine durchschnittliche prozentuale Abnahme des AW/Zeiteinheit. Da bei seiner wie bei der vorliegenden Untersuchung der Zeitpunkt der AW-Messung im Mittel 240 Minuten nach der Blutabnahme lag, wurde der AW auf diesen Zeitpunkt normiert, der dann im Durchschnitt 80,14 % seines Ausgangswertes beträgt.

Mit Hilfe der Formel

$$\text{norm. AW} = 80,14 * \text{gemess. AW} / (100 - 0,08333 * t) ;$$

wobei t = zeitlicher Abstand der AW-Messung nach der Blutabnahme in Minuten bedeutet, ist es möglich, jeden zu einem beliebigen Zeitpunkt innerhalb des ersten Tages gemessenen AW auf diesen Zeitpunkt umzurechnen.

Zur Verbesserung der Aussagekraft des AW wurde von jedem Probanden der AW dreimal bestimmt, wobei die erste Messung im Mittel 140 Minuten, die zweite 240 Minuten und die dritte 340 Minuten nach der Blutabnahme stattfand. Da diese Zeitpunkte nicht immer exakt eingehalten werden konnten, wurden die Werte nach der oben zitierten Methode von PORZ normiert und das arithmetische Mittel aus den drei Meßwerten gebildet. Die angegebenen AW-Werte sind nach dieser Methode berechnet.

2.7 Messung der Laborparameter

2.7.1 Bestimmung von Fibrinogen und Fibronectin

Die Bestimmung von Fibrinogen erfolgte mit NOR-Partigen Immundiffusionsplatten (No. OSLH 02/03, Charge 058506; Behringwerke, Marburg) mit einem Meßbereich von 0,6 - 9,06 g/l Fibrinogen. Von den zwölf vorhandenen Auftragsstellen je Platte wurden die erste und die letzte Auftragsstelle mit Kontrollplasma für NOR-Partigen (No. OSMI 06/07, Charge

048904 D) unverdünnt beschickt. Dieses Vorgehen sollte die Funktionstüchtigkeit der einzelnen Platte während der Zeit zwischen der ersten und letzten Auftragung gewährleisten und das Einhalten des Vertrauensbereiches (lt. Hersteller Präzipitatdurchmesser $6,5 \text{ mm} \pm 0,3 \text{ mm}$) kontrollieren. Der Fibrinogengehalt der Plasmaproben wurde nach Ablesen der Präzipitatdurchmesser mit Hilfe einer Bezugswertetabelle bestimmt.

Das Kontrollplasma wurde nach Vorschrift mit Aqua dest. aufgelöst. Jede Auftragsstelle wurde mit $5 \mu\text{l}$ unverdünntem Kontroll- bzw. EDTA-Plasma gefüllt, wobei das Auftragen der Probandenplasmen etwa vier Stunden nach der Blutabnahme erfolgte. Die Diffusionszeit bei Zimmertemperatur betrug fünf Tage. Angebrochene Platten mußten innerhalb von zehn Tagen verwendet werden. Die Kontrollen hatten einen Variationskoeffizienten (v_k) von 0,013. Die Fibrinogenkonzentrationen der Probandenproben ($n = 38$) betrugen:

$$\bar{x} = 4,56 \text{ g/l} \pm 1,18 \text{ g/l; } v_k 0,26$$

Die Bestimmung von Fibronectin erfolgte mit LC-Partigen Immundiffusionsplatten (Charge K/Z 4050; Behringwerke, Marburg) mit einem Meßbereich von 30 - 300 mg/l. Diese Platten sind im freien Handel noch nicht erhältlich, jedoch vom Werk zu beziehen.

Von den 12 vorhandenen Auftragsstellen je Platte wurden durchschnittlich drei mit Protein-Standardplasma (human, No.

OTFI 02/03, Charge 041109 S) in den Konzentrationen 1:1, 1:2, 1:4 und zum Teil zusätzlich 1:8 beschickt. Einerseits diente dies der Kontrolle der Funktionstüchtigkeit der einzelnen Platte, zum anderen zur Berechnung der Fibronectinkonzentrationen. Die Auftragsmenge betrug sowohl beim Standardplasma als auch bei den Proben 20 μ l. Das Protein-Standardplasma wurde nach Vorschrift des Herstellers mit Aqua dest. aufgelöst und dann mit physiologischer NaCl-Lösung weiterverdünnt. Die EDTA-Plasmaproben von 35 Probanden waren tiefgefroren und an einem Tag 2 Minuten bei 37 °C aufgetaut worden. Diese Methode des Auftauens ist bei ERIKSEN et al. (19) beschrieben. Da auf einer Testplatte fast alle Proben nach fünftägiger Diffusion den vom Hersteller erlaubten Maximaldurchmesser von 10,0 mm überschritten, wurden alle Proben auch mit einer mit physiologischer NaCl-Lösung vorgenommenen Verdünnung von 1:2 aufgetragen.

Aus den quadrierten Werten der Präzipitatsdurchmesser der Standard-Plasmaproben ($n = 35$) wurde eine Standardgerade für die vier Konzentrationen 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 erstellt:

$$y = 21,85 + 0,285 x$$

$$r = 0,9980$$

Daraus wurden die Fibronectinkonzentrationen der Probandenproben ($n = 35$) berechnet.

Plasma unverdünnt: $\bar{x} = 383,5 \text{ mg/l} \pm 61,21 \text{ mg/l}$, vk 0,160

Plasma 1:2 : $\bar{x} = 412,5 \text{ mg/l} \pm 63,38 \text{ mg/l}$, vk 0,154

Die Differenz zwischen dem unverdünnten und dem verdünnten Plasma betrug im Mittel 28,9 mg/l. Für die weiteren Berechnungen wurden die Werte des verdünnten Plasmas zugrunde gelegt, da damit der Meßbereich der Platten eingehalten werden konnte. Demgegenüber wurde die durch den Verdünnungsvorgang bedingte Ungenauigkeit geringer bewertet.

2.7.2 HDL-C und LDL-C Bestimmung

Die Bestimmung des HDL-C (s. 2.1.1) wurde im klinischen Laboratorium des Deutschen Herzzentrums durchgeführt. •Durch die Einwirkung von Phosphorwolframsäure/ Mg^{2+} werden VLDL, LDL und Lipoprotein (a) ausgefällt (2). Nach Zentrifugation wird im Überstand enzymatisch nach der CHOD-PAP Methode (45) Cholesterin bestimmt. Die erhaltenen Werte entsprechen HDL-C (3). LDL-C wurde dort mit der Formel nach Friedewald (22) berechnet:

$$\text{LDL-C (mmol/l)} = \text{Gesamt-Cholesterin} - \text{HDL-C} - \text{Trigl./2.2} ,$$

wobei $\text{Trigl./2.2} = \text{VLDL-Cholesterin}$ bedeutet. Dieser rechnerische Wert stimmt, unter Beachtung gewisser Voraussetzungen (Nüchternserum, Triglyzeride $< 4,6 \text{ mmol/l}$), sehr gut ($r = 0,98$) mit dem mittels Ultrazentrifuge ermittelten Wert überein (52).

2.7.3 Weitere Laborparameter

Außerdem wurden bei jedem Probanden neben den bisher genannten Bestimmungen die als Risikofaktoren für eine KHE bekannten Laborparameter Cholesterin, Triglyzeride und Harnsäure in die Untersuchung miteinbezogen. Es wurden jeweils die Nüchternserumkonzentrationen bestimmt.

Die Laborparameter der KHE-Patienten (Tab. 2) konnten wir vom Deutschen Herzzentrum in unsere Untersuchung übernehmen. Bedingt durch die meist sehr kurze Verweildauer in der Klinik stammten sie meist von der Aufnahmeuntersuchung. Die Blutabnahme für die AW-Messung und die übrigen Untersuchungen erfolgte entweder am gleichen oder an einem der nächsten Tage.

Von den Probanden der Kontrollgruppe wurde das Blut für die Laboruntersuchungen (Tab. 2) und die AW-Messung am gleichen Tag abgenommen und für die drei oben genannten Bestimmungen in das klinisch-chemische Labor des Max Planck Instituts für Psychiatrie (Prof. Dr. Dr. D. Stamm) geschickt.

Die unterschiedlichen Bestimmungsmethoden für Harnsäure und Triglyzeride waren für die vorliegende Untersuchung ohne Bedeutung, da Vergleichsuntersuchungen zwischen den jeweiligen Methoden bei Harnsäure überhaupt keinen und bei den Triglyzeriden nur einen Unterschied von $\pm 5 \%$ ergaben (49).

Die Untersuchungen in beiden Labors unterlagen den Richtlinien der Bundesärztekammer. Die erforderliche Präzision der

Tab. 2: Weitere Laboruntersuchungen

- KHE-Patienten (Deutsches Herzzentrum):

Cholesterin	CHOD-PAP Methode (45)
Triglyzeride	Vollenzymatische Bestimmung (57)
Harnsäure	Urica-Quant [®] , enzymatischer Farbtest (33)

- Kontrollpersonen (MPI f. Biochemie):

Cholesterin	CHOD-PAP Methode (45)
Triglyzeride	enzymatische Bestimmung nach KOH-Verseifung (18)
Harnsäure	Aldehyd-Dehydrogenase Reaktion (27)

Qualitätskontrollen wurde im gesamten Untersuchungszeitraum für die jeweils angewandte Bestimmungsmethode von Cholesterin, Triglyzeriden und Harnsäure erreicht.

2.8 Statistische Methoden

2.8.1 Überblick

Die klinische Validierung des AW als geeigneter Test zur Risikoerkennung einer KHE wurde bereits von PORZ et al. (44,46) durchgeführt. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Zusammenhänge zwischen Fibrinogen, Fibronectin und HDL-Cholesterin, sowie den altbekannten Risikofaktoren Cholesterin, Triglyzeride und Harnsäure und dem AW zu unter-

suchen. Diese Laborwerte wurden parallel bestimmt. Die Aussagekraft dieser Werte als Risikoindikator einer KHE wurde miteinander verglichen. Dazu war eine Zuordnung der Probanden zu den oben bereits beschriebenen Kriterien notwendig. Die parallele Bestimmung des AW und der klinischen Labortests sollte auch die Möglichkeit aufzeigen, ob die Effizienz des AW als Risikoindikator einer KHE noch gesteigert werden kann.

Zum Vergleich der Mittelwerte der gemessenen Werte wurde wegen des Umfangs der Stichprobe und der daraus resultierenden Verteilung anstelle des eine Normalverteilung voraussetzenden parametrischen t-Tests der verteilungsunabhängige parameterfreie U-Test von WILCOXON, MANN und WHITNEY durchgeführt. Aus den gleichen Gründen und um die Wirkung von Ausreißern abzuschwächen, bot sich für die Prüfung einer Korrelation zwischen zwei Meßparametern der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient an.

Die Abhängigkeit einer Variablen von zwei Einflußgrößen wurde in einigen Fällen mit der multiplen Korrelation, um den Einfluß weiterer Variablen auf eine Korrelation auszuschalten, der partielle Korrelationskoeffizient berechnet.

Zur Beurteilung der Qualität als Risikoindikator einer KHE wurden vom AW und den erwähnten Laborparametern Sensitivität, Spezifität und Effizienz, sowie der sogenannte Vorhersagewert nach GALEN und GAMBINO (23) berechnet.

2.8.2 Mittelwertvergleich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe mit dem U-Test (47)

Der U-Test prüft die Alternativhypothese, ob die Meßwerte der Stichproben sich mit einer größeren Wahrscheinlichkeit als 0,5 voneinander unterscheiden.

Zu Beginn der Berechnung bringt man die Meßwerte ($m + n$) der zu vergleichenden Stichproben in eine gemeinsame aufsteigende Rangfolge, wobei bei jeder Rangzahl vermerkt wird, von welcher Stichprobe sie abstammt. Die Summe der Rangzahlen der jeweiligen Stichprobe wird mit R_1 bzw. R_2 bezeichnet. Die Prüfgröße U_1 wird mit der Formel

$$U_1 = mn + m(m + 1)/2 - R_1$$

berechnet, wobei m und n den Umfang der Stichproben bezeichnen. Die Berechnung von U_2 erfolgt entsprechend durch Einsetzen von n und R_2 in die Formel. Die gesuchte Prüfgröße ist die kleinere der beiden Größen U_1 und U_2 .

Die Alternativhypothese wird angenommen, wenn der berechnete Wert U kleiner oder gleich dem aus der Tabelle entnommenen Wert ist. Für jedes Signifikanzniveau gibt es eine eigene Tabelle. In der vorliegenden Untersuchung wurde von einer zweiseitigen Fragestellung ausgegangen.

2.8.3 Berechnung der Korrelationen zwischen den verschiedenen Meßwerten mit der Spearman'schen Rangkorrelation (47)

Die Zusammenhänge zwischen jeweils zwei Meßwerten ließen sich am besten mit einem verteilungsunabhängigen Verfahren nachweisen. Der Umfang der Stichproben garantierte keine Normalverteilung und extreme Meßwerte hätten das Ergebnis ungerechtfertigt beeinflußt.

Zur Berechnung des Spearman'schen Korrelationskoeffizienten r_s ordnet man zunächst den zu vergleichenden Meßreihen Rangzahlen zu, bildet die Differenzen D der n Rangpaare, quadriert sie und summiert sie auf. Gleichen Werten werden mittlere Rangzahlen zugeteilt. R_s wird mit folgender Formel berechnet:

$$r_s = 1 - 6 \sum D^2 / n(n^2 - 1)$$

Die Extremwerte $+1$ und -1 bedeuten keine Differenz in der Rangordnung bzw. völlige Diskrepanz, 0 keinerlei Korrelation zwischen den Meßreihen. Mit Hilfe einer Tabelle können die Signifikanzniveaus bestimmt werden. Bei der vorliegenden Untersuchung wurde in erster Linie die Signifikanz gegenüber Null geprüft, deshalb mußte eine zweiseitige Fragestellung und eine Verdoppelung der in der Tabelle angegebenen Signifikanzniveaus in Kauf genommen werden. Die Fehler, die bei einigen Meßreihen durch aufgetretene häufige Bindungen, d.h. gleiche Rangzahl der Meßwerte verursacht wurden, wurden

durch das Einführen eines Korrekturgliedes in die Berechnungsformel eliminiert.

2.8.4 Berechnung des partiellen und des multiplen Korrelationskoeffizienten (47)

Die partielle Korrelation gibt den Grad der Abhängigkeit zwischen zwei Größen an, während weitere Einflußgrößen ausgeschaltet werden. Mit der Formel

$$r_{12.3} = (r_{12} - r_{13}r_{23}) / \sqrt{(1 - r_{13}^2)(1 - r_{23}^2)}$$

wird der partielle Korrelationskoeffizient zwischen den Größen x_1 und x_2 , bei konstantem x_3 berechnet. Die Indices der in die Formeln für die Berechnung der partiellen bzw. multiplen Korrelationskoeffizienten ($r_{12.3}$, $r_{1.23}$) eingesetzten Korrelationen (r_{12} , r_{13} , r_{23}) bezeichnen die Meßgrößen zwischen denen die Korrelationen berechnet wurden.

Umgekehrt erlaubt die multiple Korrelation

$$r_{1.23} = \sqrt{(r_{12}^2 + r_{13}^2 - 2r_{12}r_{13}r_{23}) / (1 - r_{23}^2)}$$

die Bestimmung des gemeinsamen Einflusses zweier Größen auf einen dritten. Die multiplen Korrelationskoeffizienten liegen immer zwischen 0 und 1. Bei der Prüfung des partiellen und des multiplen Korrelationskoeffizienten muß die Zahl der Freiheitsgrade um 1 verringert werden.

2.8.5 Die Berechnung von Sensitivität, Spezifität, Effizienz und Vorhersagewert

Die statistischen Maßzahlen Sensitivität und Spezifität geben die Aussagekraft einer Untersuchungsmethode wieder. Die Sensitivität gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der Kranke richtig als krank erkannt, Spezifität, nicht Erkrankte richtig ausgeschlossen werden. Fast alle Testverfahren haben nämlich eine Überschneidungszone zwischen gesund und krank. Das Ausmaß der Überlappung zwischen den Bereichen normaler und pathologischer Werte hängt demnach von der Unterscheidungsfähigkeit des Tests ab. Diese wie auch die angesetzten Grenzwerte beeinflussen Sensitivität und Spezifität (36).

Legt man Wert darauf, möglichst alle Erkrankten sicher zu erfassen und setzt entsprechende Grenzwerte an, wird man zwangsläufig viele falsch positive Ergebnisse bekommen, d.h. die Spezifität nimmt ab. Dies tut man, wenn es sich um eine ernste, aber gut therapierbare Erkrankung handelt, die nicht übersehen werden darf (23), besonders wenn sie eine niedrige Prävalenz hat. Ein so durchgeführtes Testverfahren ist in der Lage, die positiven Befunde einer genaueren Abklärung durch spezifischere Methoden zuzuführen. Umgekehrt wird eine möglichst hohe Testspezifität bei Erkrankungen gefordert, die schwerwiegend, aber nicht therapierbar sind. Wenn sowohl falsch positive wie falsch negative Ergebnisse gleich schädlich sind, wird eine möglichst hohe Effizienz angestrebt. Effizienz bedeutet das Maß der richtig als krank

bzw. gesund erkannten Personen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Untersuchungen.

Der auf dem Theorem von BAYES (5) basierende Vorhersagewert (= predictive value PV) von GALEN und GAMBINO (23) berücksichtigt die von VECCHIO (55) untersuchte Abhängigkeit der Wahrscheinlichkeit eines richtig positiven bzw. richtig negativen Ergebnisses eines Tests von der Prävalenz. Eine Steigerung des positiven Vorhersagewerts (PVpos) wird in erster Linie durch eine verbesserte Spezifität, eine Steigerung des negativen Vorhersagewerts (PVneg) vor allem durch eine verbesserte Sensitivität erzielt. Mit einem sicheren Ausschluß nicht KHE-gefährdeter Personen durch die AW-Messung wäre eine gezieltere Beobachtung und Überwachung tatsächlich Gefährdeter im Sinne einer Verlaufskontrolle mit einer den Patienten nicht belastenden Methode möglich. Deshalb spielt ein hoher PVneg gerade bei Erkrankungen mit einer hohen Prävalenz, wie der KHE, eine nicht zu unterschätzende Rolle, da dann die Wahrscheinlichkeit bei einem negativen Ergebnis nicht KHE-gefährdet zu sein tatsächlich sehr groß ist. Eine Kombination mit zusätzlichen Tests könnte dann die diagnostische Sicherheit noch zusätzlich erhöhen. Eine AW-Bestimmung im Sinn einer Vorsorgeuntersuchung wäre auch denkbar. Bei einem positiven Ergebnis wären dann weitergehendere Untersuchungsmethoden angezeigt.

Die Berechnung dieser statistischen Maßzahlen erfolgt nach folgenden Formeln:

$$\text{SENS} = \text{RP} / \text{RP} + \text{FN}$$

$$\text{SPEZ} = \text{RN} / \text{RN} + \text{FP}$$

$$\text{EFF} = \text{RN} + \text{RP} / \text{RP} + \text{FP} + \text{RN} + \text{FN}$$

$$\text{PVpos} = \text{RP} / \text{RP} + \text{FP}$$

$$\text{PVneg} = \text{RN} / \text{RN} + \text{FN}$$

wobei,

SENS = Sensitivität

SPEZ = Spezifität

EFF = Effizienz

PVpos = positiver Vorhersagewert

PVneg = negativer Vorhersagewert

und

RP = richtig positiv, d.h. Kranke richtig erkannt

RN = richtig negativ, d.h. Gesunde richtig erkannt

FP = falsch positiv, d.h. Gesunde nicht erkannt

FN = falsch negativ, d.h. Kranke nicht erkannt

bedeutet.

Das Modell von GALEN und GAMBINO (23) erlaubt unter Zuhilfenahme des Bayes' Theorems (5) bei Kenntnis der Prävalenz (PRAE) der zu testenden Erkrankung die Berechnung des Vorhersagewerts mit folgenden Formeln:

$$\text{PVpos} = \text{PRAE} * \text{SENS} / (\text{PRAE} * \text{SENS} + (1 - \text{PRAE}) * (1 - \text{SPEZ}))$$

$$\text{PVneg} = (1 - \text{PRAE}) * \text{SPEZ} / ((1 - \text{PRAE}) * \text{SPEZ} + \text{PRAE} * (1 - \text{SPEZ}))$$

Damit ist es möglich, die tatsächliche Vorhersagequalität für das Vorhandensein, bzw. Nichtvorhandensein einer Erkrankung zu berechnen.

2.9 Methoden zur Untersuchung der Dosis-Wirkung - Beziehung zwischen Fibrinogen, bzw. Fibrinogen/Albumin- und Fibrinogen/Fibronectin-Gemischen und dem AW

Während einer Akute-Phase-Reaktion ist der AW gewöhnlich erhöht, gleichzeitig besteht meist auch ein erhöhter Plasmafibrinogenspiegel. Dieser Zusammenhang und frühere Beobachtungen von BOSS (9) ließ uns die Dosis-Wirkung-Beziehung zwischen AW und Fibrinogen, bzw. Fibrinogen/Albumin- und Fibrinogen/Fibronectin-Gemischen untersuchen.

Zur Herstellung einer Stammlösung wurde humanes Forschungsfibrinogen (Charge 64928; Fa. Kabi, München) in einer Konzentration von 24 g/l in NH_2HCO - Puffer gelöst, eine Verdünnungsreihe hergestellt und die Osmolarität durch Zugabe von NaCl auf etwa 285 mOsmol eingestellt. Das weitere Vorgehen war, wie in 2.5.1. beschrieben.

Für den Versuchsablauf erwies sich eine Fibrinogenkonzentration von 8 g/l am günstigsten. Dieser Lösung fügten wir entweder humanes Albumin (Fa. Sigma, München) oder Fibronectin bei, das uns freundlicherweise von Herrn Timpl, MPI Martinsried, zur Verfügung gestellt wurde. Der Kurvenverlauf und die verwendeten Konzentrationen sind Abb. 8 zu entnehmen. Ohne Fibrinogen zeigten Albuminlösungen in Konzentrationen

zwischen 1,5 - 10 g/l, sowie eine Fibronektinlösung mit 1,4 g/l keinerlei aggregationsfördernde Wirkung.

In weiteren umfangreichen Untersuchungen wurde, um das Fibrinogen auszufällen, das Plasma 10 Minuten im Wasserbad auf 56 °C erhitzt und anschließend mit einer Hettich Mikroliter Zentrifuge zentrifugiert. Das so defibrinierte Plasma konnte keine Aggregation mehr erzeugen, nach einer zweiten zehnminütigen Erhitzung auf 64 °C kam es jedoch zu einem AW-Anstieg auf etwa 50 - 60 %. Dies bedarf zur Klärung noch weiterer Versuche, deshalb werde ich auf diese Versuchsreihe nicht weiter eingehen.

2.10 Methoden zum Kaninchen-Cholesterinversuch

Nach der Bestimmung der Ausgangswerte von AW, Erythrozytenverteilung und -gipfelvolumen, Hämatokrit, Cholesterin und Triglyzeriden wurden die drei Kaninchen fünf Wochen mit einer Arteriosklerosediät (Sonderdiät C 2014; Fa. Altromin, Lage) ernährt. Die Bestimmung der Meßwerte erfolgte eine, zwei, vier (in dieser Versuchswoche wurden nur Cholesterin und Triglyzeride bestimmt) und fünf Wochen nach Versuchsbeginn, sowie eine, drei, fünf, acht und 20 Wochen nach der Umstellung auf Normalfutter. Ein Versuchstier mußte wegen einer Infektion nach dem 6. Meßtag aus dem Versuch ausscheiden.

3. ERGEBNISSE

3.1 Die klinische Untersuchung

3.1.1 Mittelwertsvergleich der Meßergebnisse und deren Korrelationen zum AW

Die Kriterien der untersuchten Probandengruppen wurden bereits dargelegt (s. 2.1.1). In den folgenden Kapiteln wird die KHE-Patientengruppe als KHE-Pat, die ambulante Kontrollgruppe als Kontrolle A und die stationäre KHE-freie Kontrollgruppe aus dem Deutschen Herzzentrum von Porz (43) als Kontrolle B bezeichnet.

Die Tabellen 3 - 5 beinhalten die Meßergebnisse von KHE-Pat und Kontrolle A. Schwerpunkt dieses Untersuchungsteils ist die Fragestellung, inwieweit sich Fibrinogen- und Fibronectin-Plasmakonzentrationen bei KHE-Patienten und klinisch unauffälligen Normalpersonen signifikant voneinander unterscheiden, bzw. mit dem AW korrelieren. In gleicher Weise wurden auch klinisch bekannte Risikofaktoren einer KHE miteinander in Beziehung gesetzt.

Zwischen KHE-Pat und Kontrolle A ergeben sich signifikante Konzentrationsunterschiede für Fibrinogen im Gegensatz zu Fibronectin und den KHE-Risikofaktoren Cholesterin, Triglyzeride und Harnsäure. Der Broca-Index ($\text{Ist-Gewicht} / \text{Soll-Gewicht}$; $\text{Soll-Gewicht in kg} = \text{Körpergröße in cm} - 100$)

(4), die BKS und auch das Durchschnittsalter sind bei KHE-Pat deutlich erhöht, während der HK deutlich vermindert ist. Es gibt jedoch keine signifikante Korrelation eines Meßwerts mit dem Alter.

Während bei Kontrolle A keine signifikanten Korrelationen sowohl zwischen dem AW und den übrigen Parametern als auch untereinander bestehen - mit Ausnahme nicht unerwarteter Korrelationen zwischen Cholesterin und Triglyzeriden, bzw. BKS und HK - , fallen bei KHE-Pat mehrere signifikante Korrelationen auf. Hochsignifikant ist die Korrelation zwischen Fibrinogen und dem AW, statistisch auffällig die zwischen BKS und Fibrinogen. Interessant sind auch die Zusammenhänge zwischen Broca-Index und Fibronectin, bzw. Hämatokrit.

Entsprechend werden die den Fettstoffwechsel betreffenden Ergebnisse von KHE-Pat und Kontrolle B in den Tabellen 6 - 8 aufgeführt. Am interessantesten sind einerseits die signifikanten Unterschiede der HDL-C Konzentrationen und der damit zusammenhängenden Quotienten Cholesterin/HDL-C und LDL-C/HDL-C zwischen den beiden Gruppen, andererseits die signifikante Korrelation bei KHE-Pat zwischen HDL-C und dem AW. Auffällig ist auch die Korrelation zwischen HDL-C und Fibrinogen. Sowohl bei KHE-Pat als auch bei Kontrolle B errechneten sich wie erwartet zum Teil hochsignifikante Korrelationen zwischen Cholesterin und anderen Kenngrößen des Fettstoffwechsels.

Tab. 3: Mittelwerte und Standardabweichungen von
 KHE-Pat (n = 15) und Kontrolle A (n = 12)
 Mittelwertsvergleich mit dem U-Test
 (n.s. = nicht signifikant)

Untersuchung		KHE	Kontr A	Unterschied
AW	$\bar{x}$	38,99	25,61	2p < 0,10
(%)	SD	18,77	17,36	
HK	$\bar{x}$	44,7	47,5	2p < 0,02
(%)	SD	2,79	2,77	
BKS	$\bar{x}$	17,8	6,2	2p < 0,01
(mm)	SD	10,16	4,09	
Fibrinogen	$\bar{x}$	5,16	3,54	2p < 0,002
(g/l)	SD	1,09	0,47	
Fibronectin	$\bar{x}$	0,418	0,422	n.s.
(g/l)	SD	0,059	0,051	
Chol	$\bar{x}$	6,43	6,11	n.s.
(mmol/l)	SD	0,88	0,95	
Triglyc	$\bar{x}$	2,45	2,35	n.s.
(mmol/l)	SD	1,07	1,67	
Harns	$\bar{x}$	0,383	0,384	n.s.
(mmol/l)	SD	0,085	0,106	
Alter	$\bar{x}$	56,6	46,5	2p < 0,002
(a)	SD	5,82	6,63	
Broca-Index	$\bar{x}$	1,105	0,993	2p < 0,02
	SD	0,107	0,102	

Tab. 4: Spearman'sche Rangkorrelation r_s bei KHE-Pat ($n = 15$) zwischen den Meßwerten(2p : " $\leq 0,05$; $^0 \leq 0,02$; $^+ \leq 0,01$; $^* \leq 0,002$; $^{**} \leq 0,001$; w = Wiederholung;

F'gen = Fibrinogen, F'nect = Fibronektin)

	AW	BKS	F'gen	F'nect	Chol	Trigl	Harns	Alter	HK
Broca	0,222	0,467	0,134	-0,644 ⁰	-0,086	0,013	0,110	-0,058	-0,710 ⁺
AW	---	0,444	0,779 [*]	-0,128	-0,257	0,093	0,123	0,050	-0,454
BKS	w	---	0,570 ["]	-0,407	0,368	0,213	0,344	0,108	-0,339
F'gen	w	w	---	-0,374	-0,071	-0,070	0,157	-0,074	-0,283
F'nect	w	w	w	---	-0,234	0,227	-0,304	0,421	0,542 ["]
Chol	w	w	w	w	---	0,370	0,567 ["]	-0,226	0,104
Trigl	w	w	w	w	w	---	0,359	-0,160	-0,090
Harns	w	w	w	w	w	w	---	-0,146	-0,221

Tab. 5: Spearman'sche Rangkorrelation r_s bei Kontrolle A ($n = 12$) zwischen den Meßwerten
 ($2p : " \leq 0,05; ^\circ \leq 0,02; + \leq 0,01; * \leq 0,002; ** \leq 0,001; w =$ Wiederholung;

F'gen = Fibrinogen, F'nect = Fibronectin)

	AW	BKS	F'gen	F'nect	Chol	Trigl	Harns	Alter	HK
Broca	-0,259	-0,236	-0,157	-0,090	0,210	0,196	-0,251	0,276	0,255
AW	----	0,158	0,331	0,063	0,161	0,021	0,522	0,042	0,368
BKS	w	----	0,382	-0,438	-0,288	0,028	0,156	-0,053	-0,594"
F'gen	w	w	----	-0,218	-0,463	-0,470	0,330	0,487	-0,482
F'nect	w	w	w	----	0,242	0,172	0,093	0,014	0,280
Chol	w	w	w	w	----	0,748 ⁺	0,159	-0,517	0,375
Trigl	w	w	w	w	w	----	0,019	-0,422	0,081
Harns	w	w	w	w	w	w	----	0,041	0,366

Bei KHE-Pat besteht eine hochsignifikante, bei Kontrolle A keine Korrelation zwischen AW und Fibrinogen. Durch die Untersuchung der Fibrinogen-Dosis-Wirkung - zunächst flacher Kurvenverlauf, anschließend ein fast linearer Anstieg - ergibt sich aber, daß im unteren Konzentrationsbereich, d.h. im Normalbereich, Fibrinogen wenig mit dem AW korreliert und dieser Effekt erst bei höheren Konzentrationen deutlich wird. Untersucht man die Gesamtzahl der Probanden ($n = 27$) unter diesem Gesichtspunkt, bestätigt sich diese Annahme. Die Korrelationen zum AW wurden nach Spearman berechnet.

Fibrinogen < 4 g/l ($n = 9$) $r_s = 0,325$

Fibrinogen ≥ 4 g/l ($n = 18$) $r_s = 0,706^*$ ($2p \leq 0,002$)

Das erklärt die unterschiedlichen Korrelationen bei KHE-Pat und Kontrolle A, da sich die Fibrinogenmittelwerte der beiden Gruppen hochsignifikant voneinander unterscheiden. Da aber bei der Kontrollgruppe ebenfalls hohe AW vorkamen, kann bei normalen Konzentrationen Fibrinogen nicht wesentlich an dessen Entstehung beteiligt sein. Diese Beobachtung stimmt sehr gut mit der Untersuchung über die Dosis-Wirkung von Fibrinogen überein (s. 3.2).

Auf Grund des engen physiologischen Zusammenwirkens von Fibrinogen und Fibronectin ist der Versuch gerechtfertigt, deren gemeinsamen Einfluß sowohl auf den AW, als auch auf die BKS mittels der multiplen Korrelation zu berechnen. Die

Korrelation zwischen AW und Fibrinogen verbessert sich geringfügig. Eine Veränderung der Signifikanzniveaus ergibt sich nicht.

Bei KHE-Pat $r_{s\ 1.23} = 0,799^*$ gegenüber $r_s = 0,779^*$
($2p \leq 0,002$)

bei Kontrolle A $r_{s\ 1.23} = 0,359$ gegenüber $r_s = 0,331$

Die Korrelation zwischen BKS und Fibrinogen verbessert sich ebenfalls durch die Mitberücksichtigung von Fibronectin. Trotz einer erheblichen Verbesserung der Korrelation bei Kontrolle A wird noch kein statistisch auffälliges Niveau erreicht.

Bei KHE-Pat $r_{s\ 1.23} = 0,607''$ gegenüber $r_s = 0,570''$
($2p \leq 0,05$)

bei Kontrolle A $r_{s\ 1.23} = 0,527$ gegenüber $r_s = 0,382$

Die Beziehung zwischen Fibronectin und der BKS enthält ein weiteres interessantes Detail. Betrachtet man deren Korrelation im Gesamtkollektiv ($n = 27$), so wird sie mit $r_s = -0,387''$, bedingt durch die größere Fallzahl statistisch auffällig ($2p \leq 0,05$).

Tab. 6: Mittelwerte und Standardabweichungen von
 KHE-Pat (n = 14) und Kontrolle B (n = 16)
 Mittelwertsvergleich mit dem U-Test
 (n.s. = nicht signifikant)

Untersuchung		KHE	Kontr B	Unterschied
AW	$\bar{x}$	39,44	24,94	2p < 0,10
(%)	SD	19,39	15,99	
BKS	$\bar{x}$	17,5	10,2	2p < 0,05
(mm)	SD	10,44	8,18	
Chol	$\bar{x}$	6,45	5,65	2p < 0,10
(mmol/l)	SD	0,91	1,04	
Triglyc	$\bar{x}$	2,50	1,59	2p < 0,02
(mmol/l)	SD	1,10	0,76	
HDL-C	$\bar{x}$	0,96	1,29	2p < 0,02
(mmol/l)	SD	0,28	0,38	
LDL-C	$\bar{x}$	4,35	4,04	n.s.
(mmol/l)	SD	0,91	0,90	
Chol/HDL-C	$\bar{x}$	7,29	4,69	2p < 0,002
	SD	2,63	1,61	
LDL-C/HDL-C	$\bar{x}$	4,98	3,42	2p < 0,02
	SD	2,23	1,49	
Alter	$\bar{x}$	56,5	47,6	2p < 0,02
(a)	SD	6,02	10,28	

Tab. 7: Spearman'sche Rangkorrelation r_s bei KHE-Pat

(n = 14) zwischen den Meßwerten

(2p : " $\leq 0,05$; ° $\leq 0,02$; + $\leq 0,01$;* $\leq 0,002$; ** $\leq 0,001$; w = Wiederholung;

F'gen = Fibrinogen, F'nect = Fibronectin)

	HDL-C	LDL-C	Chol/HDL-C	LDL-C/HDL-C	F'gen	F'nect
AW	-0,745 ⁺	-0,044	0,525	0,499	0,794 [*]	-0,044
BKS	-0,427	0,593"	0,647 [°]	0,704 ⁺	0,583"	-0,367
Broca	-0,307	0,193	0,309	0,296	0,061	-0,578
Chol	-0,053	0,852 ^{**}	0,484	0,618"	0,035	-0,262
Trigl	-0,376	0,081	0,490	0,591"	-0,102	0,218
Harns	-0,114	0,600"	0,431	0,539"	0,181	-0,494
HDL-C	---	-0,161	-0,864 ^{**}	-0,754 ⁺	-0,639 [°]	0,202
F'gen	w	0,250	0,624 [°]	0,637 [°]	---	-0,260
F'nect	w	-0,502	-0,391	-0,477	w	---

Da Fibrinogen und HDL-C signifikant korrelieren, wurde der Einfluß von Fibrinogen auf die Korrelation zwischen dem AW und HDL-C, bzw. von HDL-C auf die Korrelation zwischen dem AW und Fibrinogen bei KHE-Pat (n = 14) mit Hilfe der partiellen Korrelation (s. 2.8.4) untersucht. Ebenso wurden die Korrelationen zwischen BKS und HDL-C, bzw. LDL-C berechnet.

Bei konstantem Fibrinogen verschlechtert sich die Korrelation AW/HDL-C auf $r_{s\ 12.3} = -0,508$. Damit ist die Korrelation nicht mehr statistisch signifikant.

Bei konstantem HDL-C verschlechtert sich die Korrelation AW/Fibrinogen auf $r_{s\ 12.3} = 0,620''$ ($2p \leq 0,05$).

Diese Berechnungen zeigen, daß Fibrinogen und HDL-C sich in gewissem Umfang in ihrer Korrelation mit dem AW gegenseitig ergänzen. Deren multiple Korrelation (s. 2.8.4), d.h. deren gemeinsame Korrelation zum AW erreicht daher mit $r_{s\ 1.23} = 0,852^{**}$ ($2p \leq 0,001$) ein sehr hohes Signifikanzniveau. Da kein unmittelbarer Kausalzusammenhang zwischen den beiden Parametern gegeben ist, ist die Bestimmung beider Werte gerechtfertigt.

Bei konstantem Fibrinogen verschlechtert sich die Korrelation BKS/HDL-C auf $r_{s\ 12.3} = -0,087$, während die Korrelation BKS/LDL-C mit $r_{s\ 12.3} = 0,569''$ ($2p \leq 0,05$) fast unverändert bleibt. Diese Befunde deuten darauf hin, daß der AW eher in gewisser Beziehung zur HDL-C Konzentration steht, die BKS jedoch zur LDL-C Konzentration. Umgekehrt wird die multiple Korrelation von LDL-C und Fibrinogen zum AW mit $r_{s\ 1.23} = 0,744^{+}$ ($2p \leq 0,01$) deutlich signifikant, erreicht aber nicht das Signifikanzniveau der Kombination HDL-C und Fibrinogen.

Tab. 8: Spearman'sche Rangkorrelation r_s bei Kontrolle B
 (n = 16) zwischen den Meßwerten
 (2p : " $\leq$ 0,05; ° $\leq$ 0,02; + $\leq$ 0,01;
 * $\leq$ 0,002; ** $\leq$ 0,001; w = Wiederholung;
 F'gen = Fibrinogen, F'nect = Fibronectin)

	AW	Chol	HDL-C	BKS
HDL-C	0,327	0,318	---	0,003
LDL-C	0,407	0,900**	0,053	0,090
Chol/HDL-C	-0,006	0,224	-0,741*	0,093
LDL-C/HDL-C	0,050	0,228	-0,726+	-0,065
Trigl	0,346	0,553"	-0,110	0,174
Chol	0,515"	---	w	0,226
Harns	-0,040	-0,082	0,222	0,381
Broca	-0,037	0,271	-0,328	-0,108

Die folgenden Berechnungen konzentrieren sich auf Fibrinogen, HDL-C bzw. den Cholesterin/HDL-C Quotienten und den AW, da weitere Berechnungen für Fibronectin wegen gleicher Konzentrationen in den Probandengruppen und niedriger Korrelationen zum AW nicht sinnvoll erscheinen.

3.1.2 Sensitivität, Spezifität, Effizienz und Vorhersagewert des AW und von Fibrinogen im Vergleich zu ihrer Kombination

Diese Berechnungen werden mit den Probandengruppen KHE-Pat (n = 15) und Kontrolle A (n = 12) durchgeführt. Als Entscheidungsgrenze für eine KHE-Gefährdung wird ein $AW \geq 27 \%$ (44), bzw. eine Fibrinogenkonzentration $\geq 4,0$ g/l angenommen. Die Prävalenz der KHE in der Gesamtgruppe (n = 27) beträgt also 0,556.

Tab. 9: Abschätzung des KHE-Risikos durch den AW

	Kontrolle A	KHE-Pat	n	
AW < 27 %	8 (RN)	5 (FN)	13	RN = richtig negativ FN = falsch negativ
AW $\geq$ 27 %	4 (FP)	10 (RP)	14	RP = richtig positiv FP = falsch positiv
n	12	15		

SENS = 0,667

PVpos = 0,714

SPEZ = 0,667

PVneg = 0,615

EFF = 0,667

Tab. 10: Abschätzung des KHE-Risikos durch die Bestimmung
des Plasmafibrinogens

	Kontrolle A	KHE-Pat	n	
F'gen < 4 g/l	8 (RN)	1 (FN)	9	RN = richtig negativ FN = falsch negativ
F'gen ≥ 4 g/l	4 (FP)	14 (RP)	18	RP = richtig positiv FP = falsch positiv
n	12	15		

SENS = 0,933

PVpos = 0,778

SPEZ = 0,667

PVneg = 0,889

EFF = 0,815

Die gegenüber dem Fibrinogen schlechter erscheinenden statistischen Maßzahlen für den AW lassen sich durch die Auswahl von Probanden erklären, deren teilweise hoher AW bekannt war (s. 2.1.1), während sie bezüglich des Fibrinogens eine Zufallsauswahl darstellt. Auf jeden Fall zeigt eine Kombination beider Meßwerte (s. Tab. 11) eine wesentlich verbesserte Vorhersagequalität.

Tab. 11: Abschätzung des KHE-Risikos durch kombinierte
Bestimmung von AW und Fibrinogen

	Kontrolle A	KHE-Pat	n	
AW < 27 %	10 (RN)	5 (FN)	15	RN = richtig negativ
F'gen < 4 g/l				FN = falsch negativ
				RP = richtig positiv
AW > 27 % +	2 (FP)	10 (RP)	12	FP = falsch positiv
F'gen > 4 g/l				
n	12	15		
SENS	= 0,667		PVpos	= 0,833
SPEZ	= 0,833		PVneg	= 0,667
EFF	= 0,741			

Die Vorhersagewerte für eine, der männlichen Bevölkerung in der BRD als angemessen erscheinende Prävalenz der KHE von 0,150, werden nach GALEN und GAMBINO (23) berechnet.

	PVpos	PVneg
AW (27 %)	0,261	0,919
F'gen (4 g/l)	0,331	0,983
AW (27 %) +	0,413	0,934
F'gen (4 g/l)		

Das bedeutet, daß, z.B. anlässlich einer Früherkennungsuntersuchung für eine KHE, bei einem AW über 27 % und einer Fibrinogenkonzentration über 4 g/l bei über 41 % aller Männer tatsächlich eine KHE vorliegt. Dabei wird eine KHE-Prävalenz von 0,150 angenommen. Wird einer der beiden Grenzwerte nicht erreicht, kann eine KHE zu über 93 % ausgeschlossen werden.

3.1.3 Sensitivität, Spezifität, Effizienz und Vorhersagewert des AW, von HDL-C bzw. Cholesterin/HDL-C und deren Kombination mit dem AW im Vergleich

Tab. 12: Abschätzung des KHE-Risikos durch den AW

	Kontrolle B	KHE-Pat	n	
AW < 27 %	12 (RN)	5 (FN)	17	RN = richtig negativ FN = falsch negativ
AW ≥ 27 %	4 (FP)	9 (RP)	13	RP = richtig positiv FP = falsch positiv
n	16	14		

SENS = 0,643

PVpos = 0,750

SPEZ = 0,813

PVneg = 0,722

EFF = 0,733

Den Berechnungen liegen die Probandengruppen KHE-Pat (n = 14) und Kontrolle B (n = 16) zugrunde. Damit beträgt die Prävalenz in der Gesamtgruppe (n = 30) 0,467. Der Grenzwert für den AW beträgt 27 % (44). Als KHE-gefährdet gelten Männer mit einem HDL-C unter 0,91 mmol/l (4), während übernormales HDL-C (über 1,29 mmol/l) als günstig anzusehen ist.

Tab. 13: Abschätzung des KHE-Risikos durch HDL-C

(Werte unterhalb des Grenzwerts kennzeichnen erhöhtes Risiko)

	Kontrolle B	KHE-Pat	n	
HDL-C > 0,91 mmol/l	13 (RN)	7 (FN)	20	RN = richtig negativ FN = falsch negativ
HDL-C ≤ 0,91 mmol/l	3 (FP)	7 (RP)	10	RP = richtig positiv FP = falsch positiv
n	16	14		

SENS = 0,500

PVpos = 0,700

SPEZ = 0,813

PVneg = 0,650

EFF = 0,667

Am Beispiel des HDL-C sieht man die Bedeutung der Entscheidungsgrenzen. Eine sinnvolle Verwendung des HDL-C als Risikoindikator einer KHE ist nur durch das Ansetzen einer strengen Entscheidungsgrenze gegeben (Tab. 13), da sonst zwar eine erhöhte Sensitivität erzielt wird, aber eine erheblich verminderte Spezifität in Kauf genommen werden muß.

Tab. 14: Abschätzung des KHE-Risikos durch HDL-C
(Grenzwert schließt Standardrisiko ein)

	Kontrolle B	KHE-Pat	n	
HDL-C > 1,29 mmol/l	8 (RN)	2 (FN)	10	RN = richtig negativ FN = falsch negativ
HDL-C ≤ 1,29 mmol/l	8 (FP)	12 (RP)	20	RP = richtig positiv FP = falsch positiv
n	16	14		

SENS = 0,857 PVpos = 0,600

SPEZ = 0,500 PVneg = 0,800

EFF = 0,667

Eine wesentliche Verbesserung der prognostischen Möglichkeiten stellt die kombinierte Bestimmung von AW und HDL-C in Tab. 15 dar. Dabei sollte bei der Wahl der Entscheidungsgrenzen für HDL-C bereits das Standardrisiko $\text{HDL-C} \leq 1,29 \text{ mmol/l}$ miteingeschlossen sein. Nur Personen mit sehr hohem HDL-C bei erhöhtem AW würden als nicht gefährdet zählen.

Tab. 15: Abschätzung des KHE-Risikos durch die Kombination von AW und HDL-C (Standardrisiko)

	Kontrolle B	KHE-Pat	n	
AW < 27 %	14 (RN)	5 (FN)	19	RN = richtig negativ
HDL-C > 1,29 mmol/l				FN = falsch negativ
				RP = richtig positiv
AW ≥ 27 % +	2 (FP)	9 (RP)	11	FP = falsch positiv
HDL-C ≤ 1,29 mmol/l				
n	16	14		

SENS = 0,643

PVpos = 0,818

SPEZ = 0,875

PVneg = 0,737

EFF = 0,767

Nicht nur ein vermindertes HDL-C, sondern auch ein Cholesterin/HDL-C Quotient über 7 wird als Risikofaktor einer KHE betrachtet (4). Die Cholesterin/HDL-C Quotienten von KHE-Pat und Kontrolle B unterscheiden sich hochsignifikant voneinander (Tab. 6), korrelieren aber in beiden Gruppen nicht mit dem AW (Tab. 7,8). Als Risikoindikator einer KHE hat der Cholesterin/HDL-C Quotient eine gegenüber dem AW etwas gesteigerte Spezifität bei deutlich verminderter Sensitivität.

Tab. 16: Abschätzung des KHE-Risikos durch den Cholesterin/HDL-C Quotienten

	Kontrolle B	KHE-Pat	n	
Chol/HDL-C < 7	14 (RN)	8 (FN)	22	RN = richtig negativ FN = falsch negativ
Chol/HDL-C ≥ 7	2 (FP)	6 (RP)	8	RP = richtig positiv FP = falsch positiv
n	16	14		

SENS = 0,429

PVpos = 0,750

SPEZ = 0,875

PVneg = 0,636

EFF = 0,667

Die kombinierte Berücksichtigung beider Parameter (entsprechend HDL-C und AW in Tab. 13) erbringt eine noch etwas gesteigerte Spezifität bei weiter verminderter Sensitivität.

Tab. 17: Abschätzung des KHE-Risikos durch die Kombination von AW und Cholesterin/HDL-C

	Kontrolle B	KHE-Pat	n	
AW < 27 %	15 (RN)	9 (FN)	24	RN = richtig negativ
Chol/HDL-C < 7				FN = falsch negativ
				RP = richtig positiv
AW ≥ 27 % +	1 (FP)	5 (RP)	6	FP = falsch positiv
Chol/HDL-C ≥ 7				
n	16	14		

SENS = 0,357

PVpos = 0,833

SPEZ = 0,938

PVneg = 0,625

EFF = 0,667

Unter dem Gesichtspunkt einer optimalen Prognostik und höchsten Effizienz ist der kombinierten Bestimmung von AW, HDL-C und Cholesterin/HDL-C Quotienten eindeutig der Vorzug zu geben. Als positiv zählt jede Untersuchung, bei der der AW $\geq 27 \%$ ist und entweder der Cholesterin/HDL-C Quotient den Grenzwert 7 überschreitet oder die HDL-C Konzentration unter $1,29 \text{ mmol/l}$ liegt.

Tab. 18: Abschätzung des KHE-Risikos durch die Kombination des AW mit dem Cholesterin/HDL-C Quotienten, bzw. dem HDL-C

	Kontrolle B	KHE-Pat	n	
AW $< 27 \%$ o.	15 (RN)	5 (FN)	20	RN = richtig negativ
HDL-C $> 1,29 \text{ mmol/l}$				FN = falsch negativ
o. Chol/HDL-C < 7				RP = richtig positiv
				FP = falsch positiv
AW $\geq 27 \%$ +	1 (FP)	9 (RP)	10	
HDL-C $\leq 1,29 \text{ mmol/l}$				
o. Chol/HDL-C ≥ 7				
n	16	14		

SENS = 0,643 PVpos = 0,900

SPEZ = 0,938 PVneg = 0,750

EFF = 0,800

Die Umrechnung der in den Tab. 13 - 19 ermittelten Vorhersagewerte auf eine Prävalenz von 0,150 nach GALEN und GAM-BINO (23) - entsprechend der Untersuchung AW und Fibrinogen - ergibt folgende Werte:

	PVpos	PVneg
AW (27 %)	0,378	0,928
HDL-C (0,91 mmol/l)	0,321	0,902
HDL-C (1,29 mmol/l)	0,232	0,952
Chol/HDL-C (7)	0,377	0,897
AW (27 %) + HDL-C (1,29 mmol/l)	0,476	0,933
AW (27 %) + Chol/HDL-C (7)	0,504	0,892
AW (27 %) + HDL-C (1,29 mmol/l) o. Chol/HDL-C (7)	0,647	0,937

Aus diesen Daten geht hervor, daß man in unserer männlichen Bevölkerung mit einer KHE-Prävalenz von etwa 0,150 einen richtigen positiven Vorhersagewert von fast 65 % findet, wenn der AW den Grenzwert von 27 % überschreitet und gleichzeitig entweder der Cholesterin/HDL-C Quotient über 7 oder HDL-C unter 1,29 mmol/l liegt. Wenn wenigstens einer dieser Grenzwerte unterschritten wird, kann man eine KHE mit einer Wahrscheinlichkeit von über 93 % ausschließen.

3.2 Die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Fibrinogen, bzw. Fibrinogen/Albumin- und Fibrinogen/Fibronectin-Gemischen und dem AW

Die Fibrinogen-Dosis-Wirkungskurve (Abb. 8) zeigt nach zunächst flachem Verlauf einen steilen Anstieg bei Konzentrationen von 6 - 12 g/l. In diesem Bereich besteht eine hervorragende Korrelation ($r = 0,977$; $n = 14$) zwischen dem AW und der Fibrinogenkonzentration. Bemerkenswert ist vor allem der AW-Anstieg nach zusätzlicher Fibronectinzugabe, der noch deutlich über den der Gesamtproteinkonzentration entsprechenden AW hinausgeht. Im Gegensatz dazu verursacht Albuminzugabe, bezogen auf die Fibrinogenkonzentration einen erhöhten AW, auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen aber einen erniedrigten AW. In der Abb. 8 erscheint dies als Rechtsverschiebung.

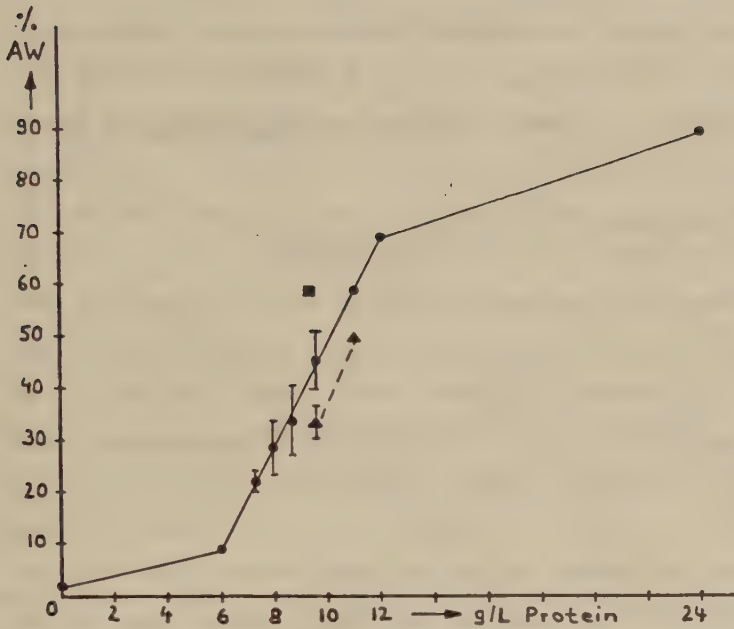


Abb. 8: Dosis-Wirkungskurve

- g/l Fibrinogen
- ▲ g/l Gesamtprotein
(8 g/l Fibrinogen + Albumin)
- g/l Gesamtprotein
(8 g/l Fibrinogen + Fibronectin)

3.3 Der Kaninchen-Cholesterinversuch

In der ersten Versuchsphase verursachte die Arteriosklerosediet schwere Veränderungen im Stoffwechsel. Während die Triglyzeride nur einen relativ geringeren Anstieg von durchschnittlich 55 mg/dl auf 182 mg/dl, d.h. etwa um 229% verzeichneten, stieg das Cholesterin von 15 mg/dl auf durchschnittlich 2114 mg/dl, was einer Steigerung von über 14000% entspricht. Die Glucosekonzentration sank um etwa 18% von 130 mg/dl auf 106 mg/dl. Der AW zeigte während dieser Phase keinen einheitlichen Verlauf. Nach einer Steigerung von 7,49 % auf 11,85 % sank der AW zum Ende dieser Versuchsphase wieder auf 9,14 % ab; das sind nur noch 22% über dem Ausgangswert. Der AW war zu dieser Zeit nur mit Einschränkungen sicher zu bestimmen, da sich bei zwei Tieren fünf Wochen, bei dem vorzeitig ausgeschiedenen Tier bereits eine Woche nach Versuchsbeginn eine zweite größere Erythrozytenpopulation herausbildete und die stark lipämischen Plasmen keine deutlichen Täler zwischen den aggregierten und nichtaggregierten Zellen erkennen ließen. Sehr auffällig war der Abfall des Hämatokrits von durchschnittlich 41,5 % auf 23,5 %. Dieser Befund spricht für eine ausgeprägte Anämie, zudem waren die Tiere in einem stark reduzierten Allgemeinzustand, womit die Infektionsanfälligkeit erklärt werden könnte.

Nach der Umstellung auf Normalfutter kehrten die Laborwerte im Lauf von 20 Wochen mit Ausnahme vom Cholesterin wieder zu den Ausgangswerten zurück. Cholesterin fiel nur auf 36 mg/dl, d.h. etwa das Zweieinhalbfache des ursprünglichen

Werts, der AW nach einem vorübergehenden Anstieg auf 5,11 % ab, der Zustand der Tiere normalisierte sich wieder.

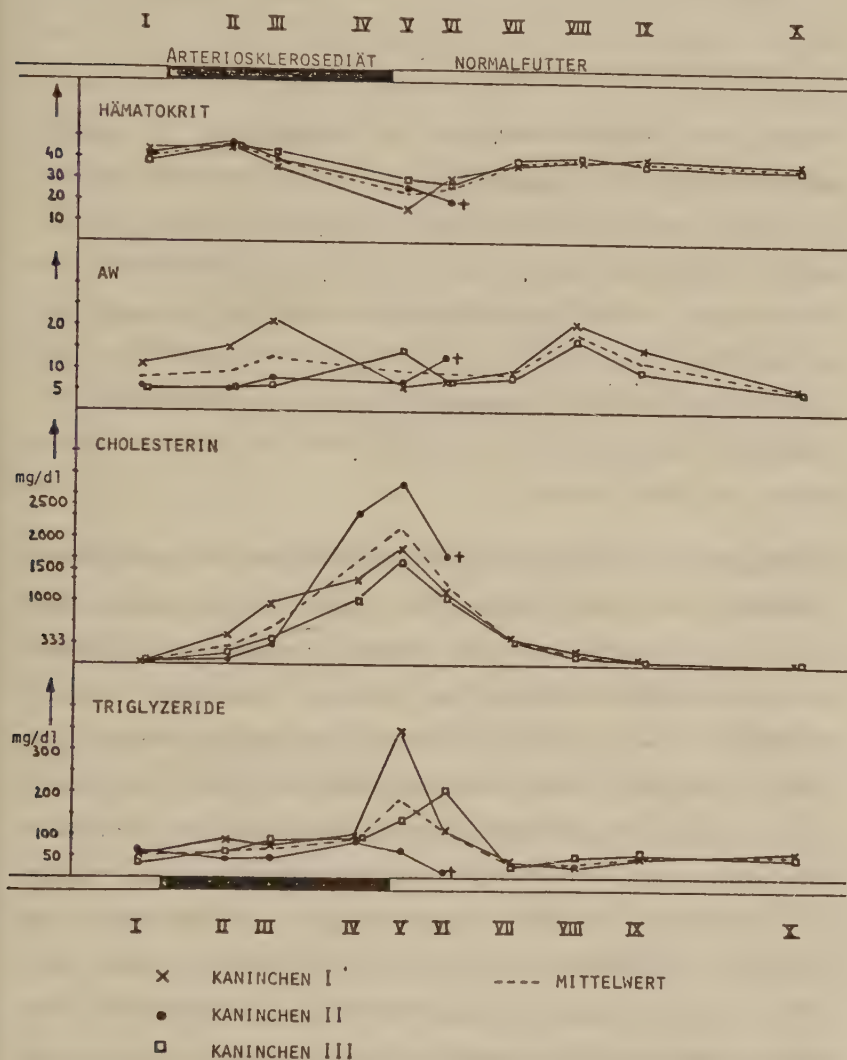


Abb. 9: Verlauf der Meßwerte

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

4.1 Der klinische Versuch

Durch die in vitro Messung von Hämatokrit, Plasmaviskosität, Erythrozytenaggregation und Erythrozytenverformbarkeit wird deren Einfluß auf die Vollblutviskosität untersucht. Mangels der Möglichkeit echter in vivo Messungen sind aber diese in vitro gewonnenen Erkenntnisse nur bedingt auf die tatsächlichen Verhältnisse im Kreislaufsystem Übertragbar. Man muß sich damit abfinden, mit "Kunstprodukten" zu arbeiten. Die Arbeit von ERNST (20) beschreibt diese Schwierigkeiten genauer.

Die Temperatur beeinflußt das Fließverhalten des Blutes ebenfalls, was sich besonders bei einer Kälteagglutination negativ bemerkbar macht. Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Schubspannung, d.h. der Druck im jeweiligen Strombahnbereich. Beim Schock, der durch eine Reihe pathophysiologischer Abläufe einen Blutdruckabfall zur Folge hat, tritt das sogenannte sludge-Phänomen mit massiv erhöhter Erythrozytenaggregation auf. Diese Erythrozytenaggregation hängt aber nicht nur von der Schubspannung, sondern auch vom Hämatokrit und Plasmafaktoren ab. Ebenso läßt die stark verminderte Schubspannung in poststenotischen Abschnitten des Gefäßsystems die Blutviskosität stark ansteigen und das Ausmaß der - gerade bei niedrigen Schergeschwindigkeiten auf-

tretenden - Erythrozytenaggregation bestimmt das Schicksal des abhängigen Gewebes. Die in vivo Erythrozytenaggregation ist allerdings auch kein isoliert zu betrachtender Parameter, da sie in engem Zusammenhang mit dem Vorhandensein großer Moleküle im Plasma (z.B. Fibrinogen, IgM) und damit der Plasmaviskosität, sowie des Hämatokrit und zum Teil auch der Erythrozytenflexibilität steht. Ein therapeutischer Ansatz besonders bei der Behandlung der peripheren Verschlußkrankheit besteht in der Verminderung dieser Aggregation. Auch aus diesem Grund sollte man der Messung der Erythrozytenaggregation, selbst wenn es sich wieder nur um eine in vitro Untersuchung handelt, in Zukunft mehr Beachtung schenken.

Die Untersuchung der Erythrozytenaggregation mit der hier angewandten Methode ist mit den zahlreichen Untersuchungen der Vollblutviskosität nicht direkt vergleichbar, da es sich nur um einen von mehreren dafür maßgeblichen Parameter handelt. Mit Hilfe des AW wird in erster Linie die Wirkung verschiedener Plasmafaktoren auf die Erythrozyten untersucht. Die von BOSS et al.(6) gefundenen AW-Anstiege bei Rauchern und nach einem akuten Herzinfarkt stimmen mit folgenden Beobachtungen gut überein. So finden CHMIEL et al. (11) bei Rauchern im Bereich sehr niedriger Schergeschwindigkeiten eine signifikant erhöhte Vollblutviskosität bei gleicher Plasmaviskosität. Herzinfarktpatienten bis zum dritten Tag zeigen einen vergleichbaren Befund, wobei deren Plasmaviskosität im Verlauf der nächsten Tage massiv ansteigt. JAN et al. (29) beschreiben hingegen schon in den

ersten Tagen nach einem akuten Myokardinfarkt eine erhöhte Plasmaviskosität.

Im Zusammenhang mit dieser und weiterer Arbeiten von BOSS et al. und PORZ et al. (6-8,44,46) verdient eine Untersuchung von LOWE (37) besondere Beachtung, da er nicht akute Myokardinfarkte untersuchte, sondern verschieden schwer ausgeprägte koronare Herzerkrankungen. Deren Vollblutviskosität, bzw. die auf diese einwirkenden Einzelparameter, vergleicht er mit denen von gesunden Probanden und findet dabei eine signifikant erhöhte Vollblutviskosität, die er im wesentlichen auf erhöhte Fibrinogen- und Hämatokritwerte zurückführt.

Als wichtigste Faktoren für die Entstehung einer Erythrozytenaggregation werden allgemein Fibrinogen (10,11,17,29), ferner IgM und Alpha-2-Makroglobulin betrachtet. Sie gelten auch als hauptverantwortlich für eine erhöhte BKS, besonders nach Herzinfarkt (48). Einige unserer Befunde sprechen allerdings dafür, daß bei der Erythrozytenaggregation noch weitere Parameter eine wichtige Rolle spielen.

Bei den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen fällt eine signifikant erhöhte Plasmafibrinogenkonzentration der KHE-Patienten auf. Fibrinogen ist auch der einzige Parameter im ersten Teil der Untersuchung, der signifikant mit dem AW korreliert. Diese Korrelation besteht allerdings nur bei den KHE-Patienten, im Gegensatz zur Kontrollgruppe A. Teilt man das Gesamtkollektiv in zwei Gruppen mit normaler und erhöhter Fibrinogenkonzentration, so findet man bei höheren

Konzentrationen eine hochsignifikante Korrelation zum AW, die an eine zumindest partielle Kausalbeziehung denken läßt, während im Normalbereich keine signifikante Korrelation zum AW gefunden wurde. Bei normalen oder geringgradig erhöhten Fibrinogenkonzentrationen müssen deshalb noch andere Faktoren an der Entstehung des AW beteiligt sein.

Zwischen Hämatokrit und AW treten übereinstimmend mit früheren Beobachtungen keine signifikanten Korrelationen auf. Dies ist wahrscheinlich auf die starke Verdünnung (1 : 30 000) der Proben bei der AW-Messung zurückzuführen. Um Vollblutviskositätsmessungen überhaupt vergleichbar zu machen, muß der Hämatokrit auf einen bestimmten Wert normiert werden, da er die Messung am stärksten beeinflußt (38). Der AW reagiert hingegen vor allem auf plasmagebundene Faktoren. Wenn die Fragestellung genauere Information über die aggregierende Wirkung des Plasmas fordert, dürfte die AW-Messung gut geeignet sein.

Eine von PORZ et al. (44) in mehreren Untergruppen beschriebene hochsignifikante Korrelation zwischen BKS und AW ist nur schwach nachweisbar. Lediglich zwischen BKS und Fibrinogen bei den KHE-Patienten, bzw. zwischen BKS und Hämatokrit bei Kontrolle A wird Signifikanz auf niedrigem Niveau erreicht.

Ein signifikanter Unterschied der Fibronectinkonzentration konnte zwischen KHE-Patienten und gesunden Probanden nicht gefunden werden. In beiden Gruppen wurde auch weder eine Korrelation zwischen Fibronectin und Fibrinogen noch

zwischen Fibronectin und dem AW gefunden. Die multiplen Korrelationen von Fibrinogen und Fibronectin zum AW und zur BKS zeigen, verglichen mit denen von Fibrinogen alleine, keine signifikante Verbesserung des Signifikanzniveaus.

Unsere Messungen beschränkten sich auf das plasmalösliche Fibronectin, während das an die Zelloberfläche gebundene und vor allem von Endothelzellen als Antwort auf eine Gefäßwandverletzung (12) vermehrt gebildete Fibronectin unberücksichtigt blieb. Die von STENMAN (53) gefundene hohe Fibronectinkonzentration in arteriosklerotischen Läsionen, führten KLINGEMANN (34) zu dem Schluß einer möglichen Beteiligung von Fibronectin bei der Pathogenese der Arteriosklerose. Eine vermehrte Fibronectinproduktion scheint aber eher Ausdruck eines aktivierten Gefäßreparatursystems und nicht pathogenetischer Faktor bei der Arterioskleroseentstehung. Für diese Annahme spricht auch eine erhöhte Fibronectinkonzentration in allen Gebieten mit erhöhter Zellproliferation.

Die auffälligsten Ergebnisse im zweiten Teil der vorliegenden Untersuchung betreffen das HDL-C und den Cholesterin/HDL-C Quotienten. Während sich die KHE-Patienten und Kontrolle B am stärksten in der Höhe des Cholesterin/HDL-C Quotienten unterscheiden, fällt vor allem die hochsignifikante negative Korrelation zwischen HDL-C und AW in der Patientengruppe auf. Gleichzeitig besteht aber auch noch eine deutliche negative Korrelation zwischen HDL-C und Fibrinogen. In diesem Zusammenhang ist die bei der Behandlung mit dem Lipidsenker Clofibrat gemachte Beobachtung eines das

Fibrinogen senkenden, das HDL-C aber steigernden Effektes (16), als zumindest indirekte Bestätigung dieses Ergebnisses zu werten. Aus den daraufhin erfolgten Berechnungen der partiellen Korrelationen von Fibrinogen und HDL-C zum AW geht hervor, daß sie isoliert in wesentlich geringerem Ausmaß mit dem AW korrelieren. Dabei scheint das Fibrinogen der wichtigere Faktor zu sein. Aus ihrer multiplen Korrelation zum AW geht hervor, daß sich ein niedriges HDL-C und ein erhöhter Fibrinogenspiegel in ihrer Wirkung auf den AW gegenseitig verstärken. Auffälligerweise korreliert dagegen der Cholesterin/HDL-C Quotient nicht signifikant mit dem AW. Bei Kontrolle B besteht nur eine, auf niedrigem Niveau statistisch signifikante Korrelation zwischen Cholesterin und AW.

Diese überraschenden Beobachtungen an einer allerdings nur kleinen Fallzahl sind in erster Linie als Hinweis und Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv, insbesondere der Beziehungen zwischen AW, HDL-C und Fibrinogen zu werten. Die Auftrennung dieser Untersuchung in einen Abschnitt Beziehung des AW zu Fibrinogen und Fibronectin und einen Abschnitt AW und cholesterinabhängige Parameter, die durch die Notwendigkeit einer zweiten Kontrollgruppe gegeben war, erschweren die Beurteilung des Untersuchungsergebnisses. Unter diesem Vorzeichen müssen auch die Berechnungen von Sensitivität, Spezifität und Vorhersagewert gesehen werden.

Trotz dieser Einschränkungen ergeben sich eine Reihe interessanter Aspekte. Obwohl Fibrinogen wie der AW als Risikoindikator einer KHE nur dann geeignet sind, wenn die Ausschlusskriterien für die AW-Messung, bzw. Situationen mit bekannt erhöhtem Fibrinogen, insbesondere der akuten Phase, beachtet werden, so scheint neben dem AW (44,46) auch das Fibrinogen eine gewisse Aussagekraft zu haben. MEADE et al. (39) finden in einer prospektiven Untersuchung bei an KHE Verstorbenen gegenüber Überlebenden u.a. eine signifikant erhöhte Fibrinogenkonzentration. Ebenso korreliert sie mit dem klinischen Verlauf einer peripheren Verschlusskrankheit (15). Letztlich ist aber noch nicht geklärt, ob die Höhe der Fibrinogenkonzentration ursächlich das Schicksal der Patienten bestimmt oder ob sie eine Antwortreaktion auf eine bestehende Gefäßschädigung ist. Für den AW gelten ähnliche Überlegungen. Eine an Diabetikern durchgeführte Untersuchung deutet eher auf eine Antwortreaktion hin (46).

Die Rolle des HDL-C als Risikoindikator einer KHE ist bereits mehrfach in größeren Studien untersucht worden. Die Autoren der Tromsø Heart Study (42) finden einen gegenüber LDL-C dreimal besseren Vorhersagewert für eine zukünftige KHE. Die Israeli Ischaemic Heart Disease Study (59) und die Framingham Study (25) kommen zu einem vergleichbaren Ergebnis., obwohl in diesen Studien das Durchschnittsalter der Probanden wesentlich höher ist. Eine isolierte Betrachtung der HDL-C Konzentration kann jedoch zu Trugschlüssen führen, wenn man die Ernährungsgewohnheiten unberücksichtigt läßt. In den Ländern Afrikas und Asiens mit einer fettarmen Er-

nährung ist die KHE-Morbidität gering trotz sehr niedriger HDL-C Konzentrationen bei allerdings sehr niedrigen Gesamtcholesterinkonzentrationen (35). Deshalb sollte auch auf den Cholesterin/HDL-C Quotienten geachtet werden, der u.U. noch eine bessere Trennung zwischen KHE-gefährdet und nicht gefährdet erlaubt (4). Im Widerspruch zu diesen epidemiologischen Untersuchungen steht das Ergebnis einer Studie von CREMER (14), der den Plasmalipoproteinstatus von koronarangiographierten Patienten mit den Ergebnissen der Angiographien korreliert. Betalipoproteincholesterin hat von den Einzelparametern den größten Vorhersagewert, am besten erweist sich jedoch die Kombination Serumcholesterin, Betalipoproteincholesterin und das Verhältnis Beta/Alphalipoprotein.

In der vorliegenden Arbeit wird mit einer Kombination mehrerer Meßwerte die beste Vorhersagequalität erreicht. Ein hoher AW und entweder ein zu niedriges HDL-C oder ein zu hoher Cholesterin/HDL-C Quotient führten bei einer für die BRD angenommenen KHE-Prävalenz bei Männern über 35 Jahre von 15 % zu einem positiven Vorhersagewert von fast 65 %, bzw. zu einem negativen Vorhersagewert von über 93 %. Die Kombination von AW und HDL-C, bzw. Cholesterin/HDL-C bei einer Screeninguntersuchung erscheint trotz einer vorhandenen Korrelation sinnvoll, da eine direkte kausale Verknüpfung als nicht wahrscheinlich gilt. Sowohl AW wie HDL-C reagieren auf Veränderungen der Lebensweise und korrelieren mit Risikofaktoren einer KHE (7,21,24,26,44,46). Möglicherweise haben wir mit dieser Kombination zwei Parameter gefunden,

die mit dem HDL-C mehr den kausalen Aspekt der Gefäßschädigung, mit dem AW mehr den reaktiven Aspekt einer bereits erfolgten Gefäßschädigung bewerten und damit eine Verbesserung des Vorhersagewerts für eine KHE erwarten lassen.

4.2 Die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Fibrinogen, bzw. Fibrinogen/Albumin- und Fibrinogen/Fibronectin-Gemischen und dem AW

Diese Versuche zeigen, daß, ähnlich wie bei der Dextranverdünnung, eine Mindestkonzentration hochmolekularer Substanzen vorhanden sein muß, um unter unseren Testbedingungen eine Aggregation der Erythrozyten zu induzieren. Deshalb ist eine nennenswerte AW-Erhöhung in diesem Versuch erst mit Fibrinogenkonzentrationen über 6 g/l zu erzielen, die in vivo bereits hochpathologisch sind. Die Absolutwerte der Konzentrationen sind jedoch auf Grund weiterer hochmolekularer Substanzen im Plasma nur sehr bedingt miteinander vergleichbar. Übertragen auf physiologische Verhältnisse bedeutet das, daß, im Gegensatz zu deutlich erhöhten Fibrinogenkonzentrationen, eine geringere Erhöhung bei niedrigen Ausgangswerten keinen ursächlichen Einfluß auf den AW hat. Die Ergebnisse des klinischen Versuchs bestätigen diese These (s. 3.1.1).

Ein überadditives Zusammenwirken von Fibrinogen und Fibronectin scheint vorzuliegen. Unklar ist, ob Fibronectin allein keine aggregierende Wirkung auf Erythrozyten hat oder ob die verwendete Fibronectinkonzentration zu niedrig war.

Angeichts der physiologisch vorkommenden Plasmakonzentrationen dürfte Fibronectin in vivo höchstens als Cofaktor des AW beteiligt sein.

Das relativ niedermolekulare Albumin scheint die Aggregationsfähigkeit der Erythrozyten herabzusetzen. Das entspricht der klinischen Erfahrung bei der BKS. Eine mögliche Erklärung wäre, daß eine mit Albuminmolekülen teilweise besetzte Oberfläche den größeren aggregationsfördernden Molekülen nur mehr eine verminderte Bindungsmöglichkeit bietet. Dazu paßt die Beobachtung, daß die Mischung von Plasma mit 3 %-iger Albuminlösung im Verhältnis 1:1 einen AW-Abfall von über 50 % verursachte. Sehr auffällig ist der Abfall des AW auf wenige Prozent nach Erhitzen des Plasmas auf 56 °C. Die Fällung des bei dieser Temperatur ausfallenden Fibrinogens scheint daran einen wesentlichen Anteil zu haben. Das neuerliche Entstehen einer Erythrozytenaggregation nach einer weiteren Erhitzung auf 64 °C könnte z.B. auf Konformationsveränderungen oder Polymerisationen der Plasmaproteine zurückzuführen sein, doch sind zur Klärung dieser Frage weitere Untersuchungen notwendig.

4.3 Der Kaninchen-Cholesterinversuch

Die Arteriosklerosediät führte wie erwartet zu einer massiven Erhöhung des Plasmacholesterins, das auch nach 20 Wochen anschließender normaler Fütterung immer noch nicht ganz auf den Ausgangswert zurückgekehrt war. Dazu wäre wahrscheinlich eine noch längere Versuchsdauer notwendig

gewesen. Männliche Versuchstiere hätten wegen der größeren KHE-Gefährdung des männlichen Geschlechts eventuell eine deutlichere Reaktion gezeigt. Andererseits ist bei dieser massiven Cholesterinerhöhung auch bei weiblichen Tieren eine ausgeprägte Arteriosklerose anzunehmen, die sich mit einem erhöhten AW ausdrücken sollte. Eine signifikante Erhöhung des AW konnte jedoch nicht beobachtet werden, auffällig ist jedoch bei der geringen Erhöhung des AW die zweigipflige Verlaufskurve. Das erwartete AW-Maximum am Ende der ersten Versuchsphase wurde möglicherweise durch zwei den AW beeinflussende Faktoren, nämlich durch das extreme Absinken des Hämatokrits oder durch Veränderungen an den einzelnen Erythrozyten verhindert, die nicht näher untersucht werden konnten. Bei normalen Hämatokritwerten besteht normalerweise nur eine geringe Korrelation zum AW, während bei ausgeprägter Anämie ein deutliches Absinken des AW beobachtet wird. Da außerdem bekannt ist, daß Kaninchen auf Entzündungen fast nie mit einer erhöhten BKS reagieren und die BKS und der AW zwar eine verwandte, aber keineswegs identische Reaktion der Erythrozyten darstellen, liegt die Vermutung nahe, daß hier noch ungeklärte, womöglich genetisch bedingte Ursachen eine wesentliche Rolle spielen.

Noch ungeklärt blieb die im Histogramm deutlich zu erkennende zweigipflige Volumenverteilung der Erythrozyten zur Zeit der höchsten Cholesterinwerte. Erklärungsversuche wären entweder eine zweite ernährungsbedingt makrozytär ausgebildete Erythrozytenpopulation oder durch Cholesterineinlagerungen in die Zellmembran veränderte Erythrozyten. Ein

wesentlich erhöhter Cholesteringehalt der Erythrozyten wurde unter ähnlichen Fütterungsbedingungen von VATSALA und SINGH (54) gefunden. Sie beschrieben Formveränderungen der Erythrozyten, die in unserem Versuch eventuell die Ursache der zweigipfligen Volumenverteilung waren. Auch eine Abnahme der Zellelastizität ist in diesem Zusammenhang zu diskutieren. Die von den Autoren beschriebene erhöhte Aggregationsneigung der Erythrozyten konnte, wie oben beschrieben, mit unserer Methode nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Nach der Umstellung auf Normalfutter und absinkendem Plasma-cholesterinspiegel verschwanden diese Veränderungen wieder und die Erythrozyten hatten wieder eine normale Volumenverteilung.

4.4 Ausblick

Für die zukünftige Arbeit ergeben sich mehrere Schwerpunkte. Aus epidemiologischer Sicht sollte eine prospektive Studie einen besseren Vergleich der Wertigkeit der Vorhersagequalität von AW, LDL-C, HDL-C, Cholesterin/HDL-C und Fibrinogen ermöglichen. Aus methodischer Sicht ist eine Vereinfachung der Meßmethode des AW bei zumindest gleichbleibender Zuverlässigkeit anzustreben. Aus biochemisch-physiologischer Sicht sind weitere Untersuchungen zum Mechanismus des AW notwendig, auch um seinen ihm angemessenen Stellenwert auf dem Gebiet der Hämorheologie zu erreichen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden drei Versuchsreihen zur Aufklärung des Mechanismus des AW durchgeführt.

(1) Im ersten Teil der Arbeit wurden die Korrelationen der Konzentrationen von Fibrinogen, Fibronectin, HDL-Cholesterin, sowie weiterer, klinisch bekannter KHE-Risikofaktoren zum AW bei KHE-Patienten und bei klinisch unauffälligen Probanden untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

(a) Die durchschnittliche Fibrinogenkonzentration bei der Gesamtgruppe der KHE-Patienten unterscheidet sich mit $5,16 \pm 1,09$ g/l hochsignifikant von der der Normalpersonen mit $3,54 \pm 0,47$ g/l. Während bei den KHE-Patienten auch die Korrelation zum AW mit $r_s = 0,779$ hochsignifikant ($2p \leq 0,002$) ist, ist sie bei der Normalgruppe nicht signifikant. Bei der Betrachtung der Gesamtstichprobe fällt allerdings auf, daß erst bei Fibrinogenkonzentrationen über 4 g/l die Korrelation zum AW hochsignifikant wird, eine Beobachtung, die den Ergebnissen der in-vitro Untersuchung entspricht (s.u.).

(b) Fibronectin zeigt weder Konzentrationsunterschiede zwischen den Probandengruppen noch eine Korrelation mit dem AW.

- (c) Die durchschnittliche HDL-C Konzentration liegt bei KHE-Patienten mit $0,96 \pm 0,28$ mmol/l im Vergleich zu $1,29 \pm 0,38$ mmol/l bei der Kontrollgruppe signifikant niedriger. Die Korrelation zum AW ist mit $r_s = -0,745$ ($2p < 0,01$) bei den KHE-Patienten im Gegensatz zu der Kontrollgruppe hochsignifikant.
- (d) KHE-Patienten und Kontrollpersonen unterscheiden sich in der Höhe des Cholesterin/HDL-C Quotienten noch stärker als in der Konzentration des HDL-C. Er beträgt bei den KHE-Patienten $7,29 \pm 2,63$, verglichen mit $4,69 \pm 1,61$ bei den Normalpersonen. Die Korrelation zum AW erreicht jedoch kein statistisch auffälliges Niveau.
- (e) Fibrinogen und HDL-C korrelieren auch miteinander signifikant $r_s = -0,639$ ($2p < 0,02$). Mit Hilfe der partiellen Korrelation werden die Korrelationen zwischen AW und HDL-C, bzw. Fibrinogen bei konstanter dritter Meßgröße berechnet. Das Signifikanzniveau sinkt deutlich ab. Im Gegensatz dazu wird deren gemeinsame Korrelation zum AW, berechnet mittels multipler Korrelation, mit $r_{s \ 1.23} = 0,852$ ($2p < 0,001$) hochsignifikant.
- (f) Die Vorhersagequalität des AW für eine KHE wurde ebenso wie die von Fibrinogen, HDL-C, Cholesterin/HDL-C Quotient und deren Kombinationen mit dem AW nach der Formel von GALEN und GAMBINO (23) berechnet. Dabei erwies sich eine kombinierte Bestimmung von AW und HDL-C und Berechnung des Cholesterin/HDL-C Quotienten als die Methode mit der besten Vorhersagequalität für eine KHE.

Mit einer, der männlichen Bevölkerung über 35 Jahre in der BRD entsprechenden KHE-Prävalenz von 0,150, errechnen sich folgende Werte:

Vorhersagewert des positiven Kombinationstests

$$PV_{\text{pos}} = 0,647$$

Vorhersagewert des negativen Kombinationstests

$$PV_{\text{neg}} = 0,937$$

Diese Testkombination verdoppelt in etwa die Vorhersagequalität gegenüber den Einzelbestimmungen.

- (2) In einer weiteren Versuchsreihe wurde die in-vitro Dosis-Wirkungsbeziehung von Fibrinogen allein, bzw. in Kombination mit Fibronectin und Albumin untersucht. Dabei zeigt sich, daß ein nennenswerter AW erst bei Konzentrationen über 6 g/l entsteht. Im Bereich 6 - 12 g/l besteht eine hervorragende Korrelation zum AW ($r = 0,977$; $n = 14$). Ein Fibronectinzusatz bei dieser Untersuchung bewirkt einen überproportionalen AW-Anstieg, während Albumin den AW vermindert.
- (3) Der dritte Teil der Arbeit war eine Verlaufsuntersuchung des AW bei Kaninchen während cholesterinreicher und daran anschließender normaler Fütterung. Die durch cholesterinreiche Fütterung verursachten massiven

Veränderungen im Fettstoffwechsel sind auch nach 20-wöchiger Ernährung mit Normalfutter nicht vollständig reversibel. Eine stärkere AW-Steigerung kann nicht gemessen werden; auffällig ist jedoch ein zweigipfliger Verlauf der AW-Verlaufskurve.

6. LITERATUR

- (1) AHA Committee Report: Risk factors and coronary disease. *Circulation* 62: 449A (1980).
- (2) Assmann, G. et al.: Untersuchungen zur Richtigkeit der Präzipitation von Lipoproteinen mit Phosphorwolframsäure/MgCl bei der routinemäßigen Bestimmung der HDL-Cholesterinkonzentration. In: *Lipoproteine und Herzinfarkt*, S. 45; Verlag G. Witzstrock, Baden-Baden 1979.
- (3) Assmann, G., H. Schriewer: Zur Richtigkeit der HDL-Cholesterinbestimmung. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 19: 273 (1981).
- (4) Assmann, G.: *Lipidstoffwechsel und Arteriosklerose*. Schattauer Verlag Stuttgart 1982.
- (5) Bayes, Rev. Th.: An essay toward solving a problem in the doctrine of chance. *Philos. Trans. Roy. Soc.* 53: 370 (1763).
- (6) Boss, N. et al.: Erythrozytenaggregation bei Nichtrauchern, Rauchern und Herzinfarktpatienten. *Blut* 27: 191 (1973).
- (7) Boss, N.: Die Erythrozytenaggregation bei Menschen mit Risikofaktoren eines Herzinfarktes: *Klin. Wschr.* 53: 385 (1975).
- (8) Boss, N. et al.: Red blood cell aggregation in men with coronary artery disease. *Eur. J. Card.* 12: 47 (1980).
- (9) Boss, N.: nicht veröffentlicht.
- (10) Chien, S. et al.: Shear-dependent interaction of plasma proteins with erythrocytes in blood rheology. *Am. J. Physiol.* 219: 143 (1970).
- (11) Chmiel, H. et al.: Rheologische Veränderungen des Blutes beim akuten Herzinfarkt und dessen Risikofaktoren. *Dtsch. med. Wschr.* 98: 1641 (1973).
- (12) Clark, R. et al.: Fibronectin is produced by blood vessels in response to injury. *J. exp. Med.* 156: 646 (1982).
- (13) Coulter, W. H.: U.S. Patent No 2656508 (1970).
- (14) Cremer, P. et al.: Bewertung des Plasmalipoproteinstatus von 657 koronarangiographierten Patienten mit und ohne Koronarsklerose. *Inn. Med.* 257 (1982).

- (15) Dormandy, J. et al.: Prognostic significance of rheological and biochemical findings in patients with intermittent claudication. *Brit. med. J.*: 581 (1973;iv).
- (16) Dormandy, J., J.Gutteridge: Effect of clofibrate on blood viscosity in intermittent claudication. *Brit. med. J.*: 259 (1974;iv).
- (17) Dormandy, J. et al.: Hemorrheologic changes following acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 104: 1364 (1982).
- (18) Eggstein, M., F.M.Kreutz: Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe. *Klin. Wschr.* 44: 262 (1966).
- (19) Eriksen, H.O. et al.: Plasma fibronectin concentration in normal subjects. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 42: 291, 1982.
- (20) Ernst, E.: Zur meßtechnischen Erfassung der Blutviskosität. *LaborPraxis i. d. Medizin*: 18 (11/1982).
- (21) Fehily, A.M. et al.: Dietary determinants of lipoproteins, total cholesterol, viscosity, fibrinogen and blood pressure. *Am. J. Clin. Nutr.* 36: 890 (1982).
- (22) Friedewald, W.T. et al.: Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18: 499 (1972).
- (23) Galen, R.S. und S.R.Gambino: Norm und Normabweichung klinischer Daten. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1979.
- (24) Glueck, C.J.: Cradle-to-Grave Atherosclerosis: High density lipoprotein cholesterol. *J. Am. College Nutrition* 1: 41 (1982).
- (25) Gordon, T. et al.: High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am. J. Med.* 62: 707 (1977).
- (26) Gotto, A.M.Jr., B.M.Rifkind: Introduction: The current status of high density lipoproteins. *Atherosclerosis Reviews* 9 (1982).
- (27) Haeckel, R.: The Use of Aldehyde Dehydrogenase to Determine H_2O_2 -Producing Reactions. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 14: 101 (1976).
- (28) Heyden, S.: Risikofaktoren für das Herz. Ergebnisse und Konsequenzen der Post-Framingham Studien, Boehringer Mannheim 1974 zit. n. Epstein, *Circulation* 48: 185 (1973).

- (29) Jan,K.-M. et al.: Observations on blood viscosity changes after acute myocardial infarction. *Circulation* 51: 1079 (1975).
- (30) Kachel,V.: Methoden zur Analyse und Korrektur apparativ bedingter Meßfehler beim elektronischen Verfahren zur Teilchengrößenbestimmung nach Coulter. Dissertation, TU Berlin 1972.
- (31) Kachel,V.: Eine elektronische Methode zur Verbesserung der Volumenauflösung des Coulter-Partikelvolumenmeßverfahrens. *Blut* 27: 270 (1973).
- (32) Kachel,V.: Electrical resistance pulse sizing (Coulter sizing). in: Melamed,M., P.Mullaney and M.Mendelson: *Flow Cytometry and Sorting*. J.Wiley & Sons, New York 1979.
- (33) Kageyama,N.: A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with Uricase-Catalase system. *Clin. Chim. Acta* 31: 421 (1978).
- (34) Klingemann,H.-G.: Fibronectin. *Dtsch. med. Wschr.* 107: 1361 (1982).
- (35) Knuiman,J.T. et al.: Serum total and high density lipoprotein cholesterol concentrations and body mass index in adult men from 13 countries. *Am. J. Epid.* 116: 631 (1982).
- (36) Lang,H. et al.: *Validität klinisch-chemischer Befunde*. Springer, Berlin Heidelberg New York 1980.
- (37) Lowe,G.D.O. et al.: Relation between extent of coronary artery disease and blood viscosity. *Brit. med. J.* 280: 673 (1980).
- (38) Matsuda,T. und M.Murakami: Relationship between fibrinogen and blood viscosity. *Thromb. Research Suppl.* II 8: 25 (1976).
- (39) Meade,T.W. et al.: Haemostatic function and cardiovascular death: Early results of a prospective study. *Lancet*: 1050 (1980 I).
- (40) Metzger,H. et al.: Einfluß von Partikelgröße, -form und -konsistenz auf rechtsschiefe Coulter-Verteilungskurven. *Blut* 23: 143 (1971).
- (41) Metzger,H. et al.: The calibration by electronic means of coulter counter for the determination of absolute volume of particles. *Blut* 25: 179 (1972).
- (42) Miller,N.E. et al.: The Tromsø Heart-Study. High-density lipoprotein and coronary heart-disease: A prospective case-control study. *Lancet*: 965 (1977 I).

- (43) Nordt, F.J. et al.: Flow cytometric quantitation of erythrocyte aggregation in suspensions containing dextran: Basis for a predictive and diagnostic test for coronary disease. Zur Veröffentlichung eingesandt.
- (44) Porz, P.: Klinische Prüfung des Erythrozytenaggregationswertes (AW) zur Früherkennung der koronaren Herzkrankheit. Inaugural-Dissertation, LMU München 1982.
- (45) Röschlau, P. et al.: 9th Int. Congress on clin. chemistry; Abstr. No 1, Toronto 1975.
- (46) Ruhenstroth-Bauer, G. et al.: Der Erythrozytenaggregationswert (AW) als Maß von Herzinfarkt-Risikofaktoren und von Gefäßschäden. Münch. med. Wschr. 125: 771 (1983).
- (47) Sachs, L.: Angewandte Statistik (5. Aufl.) Springer Verlag New York Heidelberg Berlin 1978.
- (48) Scherer, R. et al.: Die spezifische Wirkung der Plasmaproteine bei der Blutkörperchensenkung. Klin. Wschr. 53: 265 (1975).
- (49) Schuckliess, F.: Boehringer Mannheim, Persönliche Mitteilung.
- (50) Statistisches Bundesamt, Wiesbaden: Todesursachen 1960
- (51) Statistisches Bundesamt, Wiesbaden: Todesursachen 1981
- (52) Steele, B.W. et al.: An enzymatic approach to lipoprotein quantification. Am. J. Clin. Pathol. 73: 75 (1980).
- (53) Stenman, S. et al.: Fibronectin and Atherosclerosis. Acta med. scand. (Suppl) 642: 165 (1980).
- (54) Vatsala, T.M. und M. Singh: Changes in shape of erythrocytes in rabbits on a atherogenic diet and onion extracts. Atherosclerosis 36: 39 (1980).
- (55) Vecchio, T.J.: Predictive value of a single diagnostic test in unselected populations. N. Engl. J. Med. 274: 1171 (1966).
- (56) Volger, B. et al.: Rheological studies on the kinetics of artificial red cell aggregation induced by dextrans. Bibl. anat. (Basel) II, 83 (1973).
- (57) Wahlefeld, A.W.: Triglyzeride, Bestimmung nach enzymatischer Verseifung. in: M.U. Bergmayer, Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Auflage Bd. II, 1878ff., Verlag Chemie Weinheim 1974..

- (58) Wietelmann, H.: Untersuchungen zur Bestimmungsmethodik der Erythrozytenaggregation und zur Altersabhängigkeit dieser Meßwerte bei gesunden Probanden. Dissertation, Gießen 1978.
- (59) Yaari, S. et al.: Associations of serum high density lipoprotein and total cholesterol with total, cardiovascular and cancer mortality in a 7-year prospective study of 10 000 men. Lancet I, 1011 (1981).

Lebenslauf von Johannes Georg Ottl

20. 8. 1954	als 1. Kind von Dr. Georg und Marianne Ottl in München geboren
August 1958	Umzug von München nach Ulm
April 1961	Eintritt in die Volksschule in Ulm
Juni 1962	Umzug nach München, Besuch der Volksschule an der Wittelsbacherstraße
September 1964	Übertritt an das Wilhelmsgymnasium
Oktober 1966	Umzug nach Planegg, Wechsel an das Kurt Huber Gymnasium in Gräfelfing
Mai 1973	Abitur an dieser Schule
Juli 1973 - März 1975	- Wehrdienst
Mai 1975	Beginn des Medizinstudiums an der LMU München
August 1977 - März 1982	Werkstudent beim Blutspendedienst des Bayer. Roten Kreuzes; nach der Approbation Aushilfe als Teamarzt
November 1981	Abschluß des Medizinstudiums
Dezember 1981	Erteilung der Approbation
seit März 1982	Doktorand am Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried b. München

